Aus dem Fach Klinische Biochemie
im Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität in Marburg

KLINISCH BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR UROPORPHYRINOGEN-I-SYNTHASE UND ZUR UROPORPHYRINOGENDECARBOXYLASE IN ERYTHROZYTEN BEI AKUTEN UND CHRONISCHEN HEPATISCHEN PORPHYRIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

RUDOLF v. TIEPERMANN

aus Asendorf

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Fach Klinische Biochemie
im Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität in Marburg

KLINISCH BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR UROPORPHYRINOGEN-I-SYNTHASE UND ZUR UROPORPHYRINOGENDECARBOXYLASE IN ERYTHROZYTEN BEI AKUTEN UND CHRONISCHEN HEPATISCHEN PORPHYRIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

RUDOLF v. TIEPERMANN

aus Asendorf

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 5. April 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Friedrich Neurath
Referent: Prof. Dr. med. Manfred Doss
Correferent: Prof. Dr. med. Hans Kaffarnik

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung

I. Historisches 1

II. Pathobiochemie der Porphyrine

1. Porphyrin- und Hämbiosynthese 6

2. Kontrollmechanismen der Porphyrin- und Hämbiosynthese 11

3. Klassifikation der Porphyrien 17

III. Problemstellung 20

B. Experimenteller Teil

I. Material und Methoden

1. Reagenzien und Geräte 23

2. Untersuchungsmaterial 26

3. Biochemische Analytik der Porphyrine und Vorläufer 27

Seite

4. Enzymbestimmungen

4.1. Uroporphyrinogen-I-Synthase 29

4.2. Uroporphyrinogen-Decarboxylase 32

II. Methodendiskussion

1. Uroporphyrinogen-I-Synthase 34

2. Uroporphyrinogen-Decarboxylase 41

C. Methodische Ergebnisse

I. Uroporphyrinogen-I-Synthase 48

II. Uroporphyrinogen-Decarboxylase 57

D. Anwendung der Enzymbestimmungen in der biochemischen Diagnostik von Porphyrien

I. Uroporphyrinogen-I-Synthase 64

II. Uroporphyrinogen-Decarboxylase 87

Seite

E. Diskussion

I. Pathobiochemie der Uroporphyrinogen-I-Synthase 107

II. Pathobiochemie der Uroporphyrinogen-Decarboxylase 117

F. Zusammenfassung 124

G. Ausblick 131

H. Literatur 135

I. Anhang

Abkürzungen:

ALS	=	δ-Aminolävulinsäure
PBG	=	Porphobilinogen
URO	=	Uroporphyrin
HEPTA	=	Heptacarboxyporphyrin
HEXA	=	Hexacarboxyporphyrin
PENTA	=	Pentacarboxyporphyrin
KOPRO	=	Koproporphyrin
TRI	=	Tricarboxyporphyrin
PROTO	=	Protoporphyrin
EPP	=	erythrohepatische Protoporphyrie
AIP	=	akute intermittierende Porphyrie
PV	=	Porphyria Variegata
HKP	=	hereditäre Koproporphyrie
PCT	=	Porphyria cutanea tarda
CHP	=	chronische hepatische Porphyrie
Pb-I	=	Bleiintoxikation
ALS-D	=	δ-Aminolävulinsäure-Dehydratase
ALS-S	=	δ-Aminolävulinsäure-Synthase
URO-D	=	Uroporphyrinogen-Decarboxylase
URO-S	=	Uroporphyrinogen-I-Synthase

A. E I N L E I T U N G

I. H i s t o r i s c h e s

Ein geschichtlicher Rückblick auf die Entwicklung der Porphyrinforschung ist eigentlich ein Rückblick auf die teilweise integrierte Entwicklung zweier Wissenschaftszweige: der Medizin und der Chemie. Die erste Darstellung und Reinigung eines Hämatoporphyrins gelang THUDICHUM im Jahre 1867 (196), dem eigentlichen Begründer der Klinischen Biochemie. Er beschrieb die rote Fluoreszenz seines eisenfreien Hämatins und nannte es "Cruentine". Seine Entdeckung gerade der fluoreszierenden Eigenschaften wurde von Zeitgenossen anfangs nicht beachtet und geriet lange Jahre in Vergessenheit. Einer seiner Gegner, HOPPE-SEYLER (105), prägte als erster den Begriff "Porphyrin" mit dem Zusatz "hämato".

Erste klinische Beschreibungen einer Porphyrie sind von SCHULTZ (171) bekannt. Er diagnostizierte eine atypische Lepra, die man jedoch nach seinen Beschreibungen als klassischen Fall einer congenitalen erythropoetischen Porphyrie ansehen muß. Die im Urin dieses Patienten ausgeschiedenen Pigmente wurden von BAUMSTARK (3) untersucht und als "Urorubohämin" und

"Urofuscohämin" isoliert. BAUMSTARK interpretierte seine Befunde als erster unklar als Biosynthesestörung im Hämoglobinaufbau.

Mit der Einführung von Sulfonal als Hypnotikum entstand eine neue Erkrankung, die toxische Form der akuten Porphyrie. Der erste Befund eines hämatoporphyrinähnlichen Farbstoffes im Urin einer Sulfonalbehandelten Frau stammt von STOKVIS (185). Diese Form der Porphyrie wurde jetzt häufiger beobachtet und beschäftigte Mediziner wie Chemiker. So machte FRIEDENREICH im Jahre 1892 (80) auf die drei hauptsächlichen klinischen Symptome aufmerksam: dunkelbrauner Urin, abdominaler Schmerz und Paresen. Die chemische Natur der im Urin ausgeschiedenen Farbstoffe wurde als "Hämatoporphyrin" oder als "Hämatoporphyrin-ähnlicher Urinfarbstoff" angesehen, bis FISCHER (78) eindeutig feststellte, daß der im Sulfonal-Urin ausgeschiedene Farbstoff ein spezielles "Urinporphyrin" sei.

Um die Jahrhundertwende begann eine neue Ära in der Porphyrinforschung der Biochemiker. Das Hämatoporphyrin konnte näher charakterisiert werden, es wurden Protoporphyrin und Koproporphyrin isoliert und man führte Studien zur Strukturaufklärung des

Häm durch.

Der nächste bedeutende Schritt in der Porphyrinforschung steht in Zusammenhang mit dem Patienten MATHIAS PETRY. Dieser Patient wurde 1911 zuerst von GÜNTHER (95, 96) in einer umfassenden Veröffentlichung beschrieben, in der die Bezeichnung "Hämatoporphyrie" für eine ganze Gruppe von Porphyrien gewählt wurde: GÜNTHER unterteilte die Porphyrien in congenitale, akute toxische, akute hereditäre und chronische. Diese Einteilung, die mit Änderungen im Grundprinzip heute noch gilt, beschrieb mit der "Hämatoporphyria chronica" als eine der ersten Veröffentlichungen die PCT.

Jener Patient PETRY schied im Urin immense Mengen an Porphyrinen aus. Diese wurden vom späteren Nobelpreisträger HANS FISCHER analysiert und ermöglichten weitere Differenzierungen. FISCHER veröffentlichte 1925 seine Ergebnisse zum Fall PETRY (79) und bezog sich auf die anatomische Diagnose von BORST:"Porphyria congenita". Dieser gab vier Jahre später mit KÖNIGSDÖRFER (15) einen umfassenden Bericht über den Patienten PETRY heraus und gebrauchte dabei den Begriff "Porphyrie". Damit war der Terminus "Hämatoporphyrie" abgelöst worden, und der Ausdruck "Porphyrie" setzte sich durch.

Das ganze Werk von HANS FISCHER zu beschreiben, würde diesen Rahmen sprengen. Es kann hier nur auf seine Verdienste um die Strukturaufklärung der Porphyrine, seine Entdeckungen der beiden natürlichen Porphyrinisomeren I und III und seine erfolgreichen Porphyrinsynthesen hingewiesen werden.

Mit der Beschreibung des Porphyrinvorläufers PBG, das im Urin während einer akuten porphyrischen Attacke gefunden und von WALDENSTRÖM zuerst als "Rotes Pigment" (208), später erst als PBG bezeichnet wurde (213), traten in der Porphyrinforschung neue Aspekte auf. Im Jahre 1939 (209) zeigte WALDENSTRÖM die Bedeutung der akuten Porphyrie auf, beschrieb sie als autosomal dominant und verwies auf den Einfluß von Barbituraten als auslösende Faktoren porphyrischer Attacken.

Die Entwicklung neuer analytischer Techniken, besonders spektrophotometrischer und chromatographischer Art, beschleunigten nach dem zweiten Weltkrieg den Fortschritt der Porphyrinforschung. Aufgrund der verfeinerten Analytik und der Etablierung neuer Wissenschaftszweige, die sich aus der Medizin, Biochemie und Biophysik entwickelten, konnten die Porphyrien schon bald in ihren Frühstadien oder sogar in klinisch symptomfreien Stadien

erkannt werden.

Seit ca. 15 Jahren versuchen Biochemiker mit enzymatischen Methoden das Wesen der Porphyrien zu ergründen.

Die Porphyrien, die zu Anfang dieses Jahrhunderts als Rarität galten, erhalten im Zusammenhang mit Leber- und Blutkrankheiten und Blei- und Umweltvergiftungen immer größere Bedeutung.

Die Beherrschung dieser Stoffwechselerkrankung gelingt heute nur in der Zusammenarbeit von Klinikern und Klinischen Biochemikern. Die Fortführung der Porphyrinforschung sei vornehmster Auftrag an die Klinische Biochemie, die ja auch mit THUDICHUM am Anfang der Entwicklung stand.

II. Pathobiochemie der Porphyrine.

1. Porphyrin- und Hämbiosynthese

Der Hämbiosyntheseweg nimmt seinen Anfang in einem Intermediärprodukt des Zitronensäurezyklus, dem Succinyl-Coenzym A und einer einfachen Aminosäure, dem Glycin (175, 176). Die Kondensation von Glycin und Succinyl-Coenzym A geschieht mit Hilfe der ALS-Synthase, einem mitochondrialen Enzym, das in der gesamten Porphyrin- und Hämbiosynthese eine Schlüsselstellung einnimmt und zuerst von BURNHAM und LASCELLES (24) aus Rhodopseudomonas spheroides angereichert und untersucht wurde. Die Kondensation ist abhängig von Pyridoxalphosphat und bildet über die Zwischenstufe α-Amino-β-Ketoadipinsäure den Porphyrinvorlaufer δ-Aminolävulinsäure (137). Diese tritt aus den Mitochondrien in das Zytosol. Dort wird mit Hilfe der ALS-Dehydratase, einem Enzym, das von GIBSON (83) et al. charakterisiert wurde, aus zwei Molekülen ALS unter Wasserabspaltung ein weiterer Porphyrinvorläufer, Porphobilinogen (PBG), durch Kondensation gebildet. Das PBG ist ein Monopyrrol, dessen Struktur durch WESTALL 1952 aufgeklärt (219) wurde.

Aus vier Molekülen PBG wird, wie FALK et al. (74) zeigten, der Tetrapyrrolring der Porphyrine aufgebaut. Die Bildung des Porphyrinringes verläuft an dieser Stelle komplizierter als die bisherigen Schritte der Hämbiosynthese. Im Zytosol agieren zwei Enzyme wahrscheinlich parallel : die hitzestabile URO-S und die hitzelabile URO'gen-Cosynthase. Nach FRYDMAN et al. (82, 183) wird einerseits aus zwei Molekülen PBG durch "Kopf zu Schwanz"-Kondensation mit Hilfe der URO-S ein intermediärer Enzymsubstratkomplex "Dipyrrolmethan 2" gebildet, der die Polymerisation zu Uroporphyrinogen I startet. Andererseits wird aus zwei Molekülen PBG mit Hilfe der Cosynthase durch "Kopf zu Kopf"-Kondensation ein anderer intermediärer Enzymsubstratkomplex "Dipyrrolmethan 4" gebildet, der durch Polymerisation zu Uroporphyrinogen III führt. Die intermediären Dipyrrolkomplexe bleiben an den Enzymen gebunden und treten als Zwischenstufen nicht in Erscheinung.

Die gebildeten Uroporphyrinogene werden sowohl in der Isomerenreihe I wie III durch die URO-D im Zytosol schrittweise über Zwischenstufen

mit sieben, sechs und fünf Carboxylgruppen zum Koproporphyrinogen decarboxyliert. Die Frage, ob an diesen Decarboxylierungen nur eine URO-D oder verschiedene Abarten dieses Enzyms beteiligt sind, ist nicht endgültig geklärt (2, 23, 131, 155, 201).

Das KOPRO'gen wandert in das Mitochondrium zurück und wird dort unter oxydativer Decarboxylierung der Propionsäureseitenketten durch die Koproporphyrinogenoxydase über Tricarboxyporphyrinogen in Protoporphyrinogen umgewandelt (148). Die Koproporphyrinogenoxydase reagiert spezifisch mit dem KOPRO'gen Isomer III, so daß der Biosyntheseweg an dieser Stelle für die Isomerenreihe I beendet ist.

Sämtliche Porphyrinogene sind Hexahydroporphyrine. Diese sind farblos, fluoreszieren nicht unter UV-Licht und können unter geeigneten Bedingungen (O_2, Licht, pH-Änderungen, Säuren) leicht zu Porphyrinen oxydiert werden, die dann durch Fluoreszenz nachweisbar sind. Im Biosyntheseweg vom PBG zum (13, 91, 131) PROTO existieren allerdings nur die Porphyrinogene als physiologische Zwischenstufen. Der nächste

Biosyntheseschritt wird durch die mitochondriale Ferrochelatase katalysiert. Dieses Enzym baut Eisen-(II) in das Protoporphyrin ein. Das so entstandene Eisenprotoporphyrin 9 ist außer im Hämoglobin und Myoglobin als prostetische Gruppe in Cytochromen, Peroxydasen und Katalasen enthalten.

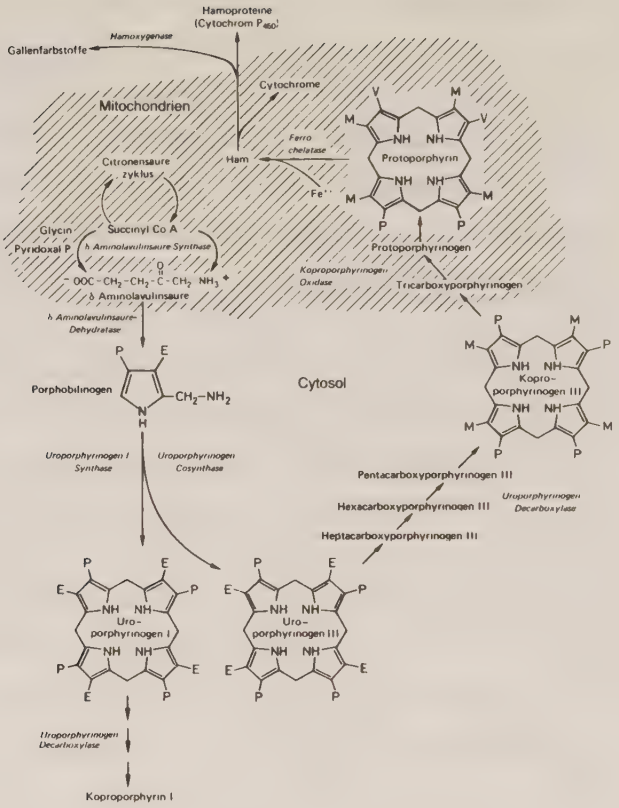


Abb. 1: Porphyrin- und Hämbiosynthese in der Leber. Substituenten: A = Essigsäure, P = Propionsäure, M = Methyl, V = Vinyl (64)

2. Kontrollmechanismen der Porphyrin- und Hämbiosynthese

Die Enzyme entlang der Hämbiosynthesekette stehen in Interaktion zueinander. Das Ziel der Biosynthese ist die ausreichende Bereitstellung von Häm. Dieses Substrat hat nicht nur Bedeutung für die Zellatmung, sondern ist ebenso wie die anderen Eisenprotoporphyrine an vielen metabolisierenden Stoffwechselvorgängen beteiligt.

Unter Einfluß exogener Faktoren, d.h. Aufnahme von Arzneimitteln wie bestimmten Sedativa und Hypnotika (21, 85, 88, 151, 165), Analgetika (77), Sulfonamiden (21, 76, 149, 154, 165), Antibiotika (152, 165, 215), Steroidhormonen (11, 90, 107, 127, 218) wird zum Zwecke der Metabolisierung dieser Stoffe der Häm-Verbrauch gesteigert. Das hat eine Induktion der Hämbiosynthese zur Folge. Dabei wird über einen Rückkopplungsmechanismus die ALS-Synthase in der Leber induziert (89, 92). Der Einfluß von Arzneimitteln und chemischen Substanzen auf den Porphyrinstoffwechsel wurde nicht nur beim Menschen beobachtet,

sondern auch an Tieren experimentell nachvollzogen (10, 109, 128). Hier sind als porphyrinogene Substanzen besonders Barbiturate (29, 30, 85, 97, 101, 165, 167, 168, 169, 184, 195), 3,5,-Dicarbäthoxy-1,4,-dihydrocollidin (29, 30, 31, 84, 92, 111, 181), Allylisopropylacetamid (1, 99, 100, 140, 147, 205), Griseofulvin, Hexachlorbenzol und andere halogenierte Phenole anzuführen.

Bei ungestörter Porphyrinbiosynthese, also bei normalem Enzymmuster entlang der Biosynthesekette, werden sämtliche Hämvorläufer in einem Ausmaß gebildet, das über der erforderlichen Konzentration liegt. Die nicht zur Hämbildung verwendeten Hämvorstufen werden ausgeschieden (5, 92, 168, 205).

Das Häm wirkt nicht nur bei Mangel auf die Aktivität der ALS-S ein, sondern auch bei übermäßiger Konzentration, sei sie physiologisch oder exogen durch Hämatin-Gabe bedingt, unterdrückt es die ALS-S (89, 100, 107, 129, 144, 156, 170, 188, 192, 216, 217).

Ein weiterer Biosyntheseschritt, der durch das Häm kontrolliert wird, ist der Einbau von

Eisen in das Protoporphyrin. Bei Untersuchungen von humanen Knochenmarkszellen wurde ein negativer Rückkopplungseffekt von Häm auf die Ferrochelatase beobachtet (16).

Der beschriebene Regulationsmechanismus und die Biosynthese geraten aus den Fugen, wenn ein oder mehrere Syntheseschritte entlang der Biosynthesekette gestört sind. Das ist immer dann der Fall, wenn die Enzyme, die zur Katalyse der einzelnen Synthesestufen notwendig sind, inhibiert werden oder eine genetisch bedingte Aktivitätsverminderung erlitten haben. So ist es bekannt, daß z. B. Schwermetalle, besonders Blei, die ALS-Dehydratase (6, 17, 44, 1o3, 132, 159, 173, 202) und die Ferrochelatase hemmen. Bei den hereditären hepatischen Porphyrien des akuten Formenkreises kennt man je nach Art der Erkrankung genetisch bedingte Aktivitätsstörungen ganz bestimmter Enzyme (65). Bei der AIP ist die URO-S (17, 41, 44, 63, 87, 115, 133, 145, 189, 198), bei der HKP die KOPRO'genoxydase (17, 20, 44, 72, 138) und bei der PV vermutlich die Protoporphyrinogenoxydase (4, 17, 44, 180) gestört (Tab.1.) (44). Diese Störungen können nur partiell

sein, denn eine völlige Inaktivität eines dieser Enzyme würde die Hämbiosynthesekette unterbrechen und wäre mit dem Leben nicht vereinbar.

Wird ein Patient, der Träger eines solchen genetischen Enzymdefektes ist, mit porphyrinogenen Substanzen belastet, dann kommt es zur Entgleisung der Porphyrin- und Hämbiosynthese. Die Folgen sind übermäßige Porphyrin- und Vorläufer-Akkumulationen, die sich in ihrer Ausscheidung widerspiegeln, und akute klinische Symptome vielfältiger Art.

In derselben Weise, wie exogene porphyrinogene Stoffe Einfluß auf die Hämbiosynthese haben, können endogene Substrate wirken. Hier sind die weiblichen Sexualhormone bzw. Steroidmetabolite zu nennen. Ihre Einwirkung auf den Porphyrinstoffwechsel ist seit langem bekannt und wurde auch experimentell in Leberzellkulturen belegt (10, 11, 32, 33, 107, 109, 141, 218). So nimmt es nicht Wunder, wenn eine latente hepatische Porphyrie während der Menstruation klinisch manifest werden kann (104, 164). Ebenso zeigt die Beobachtung, daß die Symptome und biochemischen Abnormitäten einer AIP selten vor

der Pubertät auftreten, die regulatorische Verstrickung der Hämbiosynthese mit dem Stoffwechsel der Sexualhormone (98, 210).

Tab. 1 Beobachtete und postulierte enzymatische Defekte bei den hepatischen Porphyrien und bei der Bleiintoxikation des Menschen (nach Doss) (44)

AIP	δ-ALS-Synthase ↑↑ URO'gen-Cosynthase (↑)+) Δ-5α-Steroid-Reduktase ↓	URO'gen-I-Synthase ↓	Autosomal dominant hereditär, Manifestation durch Arzneimittel, Sexualhormone und Hunger
HCP	δ-ALS-Synthase ↑↑	KOPRO'gen-Oxidase (↓)	Autosomal dominant hereditär
PV	δ-ALS-Synthase ↑↑	Ferrochelatase (↓)+)	Autosomal dominant hereditär
PCT CHP	δ-ALS-Synthase (↑) URO'gen-Cosynthase	URO'gen-I-Synthase (↑)+) URO'gen-Decarboxylase ↓↓	Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Defekt angeboren oder erworben. Manifestation bei Lebererkrankungen, Alkohol, Östrogenen, bestimmte Fremdchemikalien (HCB und andere chlorhaltige aromatische Verbindungen)
EHP	δ-ALS-Synthase (↑)+)	Ferrochelatase ↓	Autosomal dominant hereditär
Pb-I	δ-ALS-Synthase ↑↑ KOPRO'gen-Oxidase (↓)+)	δ-ALS-Dehydratase ↓↓ Ferrochelatase ↓↓	Blei hemmt die δ-ALS-Dehydratase und Ferrochelatase direkt

+) ( ) Postulierte Defekte

3. Klassifikation der Porphyrien

Eine Einteilung der Porphyrien und Porphyrinstoffwechselstörungen ist schon in vielen Übersichtsarbeiten (22, 27, 45, 52, 70, 77, 85, 93, 143, 166, 204, 208, 211, 214, 220, 221) nach dem jeweiligen Stand der Erkenntnisse über diese Erkrankungen und analytischer Möglichkeiten vorgenommen worden. WALDENSTRÖM (208) schuf 1937 mit seiner Einteilung die Grundlagen der noch heute aktuellen Klassifikation.

Wir teilen die Porphyrinopathien in drei große Gruppen ein (Tab. 2.) (45). Die beiden ersten Gruppen fassen die Erkrankungen nach dem primären Sitz der Stoffwechselstörung in erythropoetische und hepatische zusammen. Die dritte Gruppe umfaßt alle sekundären Porphyrinurien, die in der Regel hepatisch bedingt sind.

Die erythropoetischen Porphyrien untergliedern sich in die autosomal rezessive Porphyria congenita erythropoetica oder Morbus Günther und in die autosomal dominante Protoporphyria erythrohepatica bzw. Protoporphyria erythropoetica. Die hepatischen Porphyrien sind zum größten Teil ebenfalls hereditär. Es ist gesichert, daß

die drei hepatischen Porphyrien des akuten Formenkreises, die Porphyria acuta intermittens die Koproporphyria hereditaria und die Porphyria variegata autosomal dominant vererbt werden (45, 212). Die chronisch hepatischen Porphyrien einschließlich der Porphyria cutanea tarda können sowohl genetisch bedingt wie erworben sein. Die Obergänge der einzelnen Typen der chronischen hepatischen Porphyrien in einander sind fließend.

Die Gruppe der sekundären Koproporphyrinurien ist sehr heterogen. Hier sind alle Komponenten zugeordnet, die Ursache einer Porphyrinstoffwechselstörung sein können. Die Verflechtung der sekundären Porphyrinurien mit den erworbenen und auch genetisch bedingten chronischen hepatischen Porphyrien ist eng und Obergänge werden oft beobachtet.

Tab. 2 Klassifikation der Porphyrien

I. Erythropoetische Porphyrien

a) Porphyria congenita erythropoetica (autosomal rezessiv)
b) Protoporphyria erythropoetica (erythrohepatica) (autosomal dominant)

II. Hepatische Porphyrien

a) Porphyria acuta intermittens (autosomal dominant)
b) Koproporphyria hereditaria (autosomal dominant)
c) Porphyria variegata ("mixed hepatic porphyria"; autosomal dominant)
d) Chronische hepatische Porphyrien einschließlich Porphyria cutanea tarda (erworben bzw. 'konstitutionell' hereditär)
Paraneoplastische Porphyria cutanea tarda (z.B. bei Leber- oder Prostatakarzinom)
Symptomatische chronische hepatische Porphyrien (erworben z.B. durch Hexachlorbenzol, polychlorierte Biphenyle, Vinylchlorid, TCDD)

III. Sekundäre (symptomatische Koproporphyrinurien (erworben) bei

a) Intoxikationen (z.B. Alkohol, Fremdchemikalien, Schwermetalle, insbesondere Blei)
b) Leberkrankheiten (z.B. Zirrhose, Hepatitis, Fettleber, Cholestase, Alkohollebersyndrom, Hämochromatose, Arzneimittelschäden)
c) Blutkrankheiten, z.B. Hämolytische, arzneimittelinduzierte, sideroachrestische, sideroblastische, ablastische Anämien; ineffektive Erythropoese (intramedulläre Hämolyse); perniziöse Anämie; Leukämien, Hämoblastosen
d) Infektionskrankheiten
e) Diabetes mellitus
f) Eisenstoffwechselstörungen (z.B. Hämosiderose, Hämochromatose)
g) Hereditäre Hyperbilirubinämien (z.B. Dubin-Johnson-Syndrom, Rotor-Syndrom)
h) Malignom, Tumoren, Lymphogranulomatose und andere Neoplasien
i) Herzinfarkt
j) Medikamentennebenwirkungen (Analgetika, Sedativa, Hypnotika, Antibiotika, Sulfonylharnstoffderivate, Sexualhormone, z.B. Östrogene und OC-Präparate) und Narkose
k) Hungerzustand

III. Problemstellung.

Die Ursache der Porphyrinstoffwechselstörung bei der AIP ist seit Anfang der siebziger Jahre als URO-S-Defekt bekannt (41, 81, 94, 116, 126, 133, 136, 145, 157, 163, 172, 189). Dieser Enzymdefekt wurde in der Leber und in Erythrozyten mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Die bisher in unserem Arbeitskreis übliche Methode zur Aktivitätsbestimmung der URO-S war relativ aufwendig (41, 59, 163). Ein Teil dieser Arbeit soll sich mit der Ausarbeitung einer Methode beschäftigen, die es ermöglicht, umfassende Untersuchungen an größeren Kollektiven durchzuführen und den Anforderungen an ein klinisch-chemisches Labor genügt. Dabei interessiert in ganz besonderem Maße die Aussagekraft der URO-S in Familienstudien bei AIP-Familien in Korrelation zur Porphyrinausscheidung.

Bei Patienten mit klinischen und biochemischen Symptomen einer AIP wurde eine normale URO-S - Aktivität gefunden. Diese für uns unerklärlichen Befunde machen eine Untersuchung der URO-S - Aktivität bei anderen gesichert diagnostizierten akuten hepatischen

Porphyrien erforderlich, um Möglichkeiten einer Differenzierung dieser Porphyrien zu entwickeln.

Der URO-S-Defekt hat Einfluß auf die Porphyrinbiosynthese. Es soll hier versucht werden, seine Einwirkung anhand eines Enzymcharakteristikums, dem K_M-Wert, zu erklären.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen Untersuchungen zur URO-D in Erythrozyten dargelegt werden. Die Aktivität dieses Enzyms ist in der Leber untersucht worden (58). Dabei wurde ein URO-D-Defekt bei Patienten mit CHP/PCT entdeckt. Ähnliche Ergebnisse konnten in experimentellen Modellversuchen an Tieren durch Belastung mit halogenierten Phenolen und Kohlenwasserstoffen erbracht werden (57, 193, 194). Dieser URO-D-Defekt trat immer in Obereinstimmung mit den typischen Urin-Porphyrinausscheidungen auf. Hier bestätigte eine Dominanz von URO und HEPTA im Urin das Vorhandensein des Enzymdefektes (47).

Ein Nachweis des URO-D-Defektes in Erythrozyten (62, 117, 118, 119, 163) hingegen blieb nicht unwidersprochen (8, 9). In dieser Arbeit soll versucht werden, bei gesicherter CHP/PCT einen URO-D-Defekt in den Erythrozyten nachzuweisen. Dazu muß eine geeignete Bestimmungsmethode entwickelt werden, die

ebenfalls in einem klinisch-biochemischen Labor Anwendung finden kann. Die bisher durchgeführten Methoden (57, 58, 62, 163) liefern entweder nur relative Ergebnisse, die oftmals nur einen Trend andeuten, oder sie sind wegen ihrer Kompliziertheit für Routinebestimmungen nicht praktikabel. Von einigen Klinikern wird anhand der Beobachtung von häufigem Auftreten einer CHP/PCT in manchen Familien diese Erkrankung als hereditäre Porphyrie angesehen (28, 118, 142, 178, 203, 206). Dieser Behauptung soll anhand von Familienstudien nachgegangen werden. Dabei wird die Aktivität der URO-D in den Erythrozyten in Zusammenhang mit der Urin-Porphyrinausscheidung untersucht.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Material und Methoden

1. Reagenzien und Geräte

a) Reagenzien

Substanzen und Lösungsmittel:
Die Substanzen und Lösungsmittel waren kommerzieller Art und hatten den Reinheitsgrad p.A.
Aceton, Acetylaceton, Ammoniak (d=0,91), Ascorbinsäure, Benzol, Chloroform, Diäthyläther, p-Dimethylaminobenzaldehyd, Essigsäure (d=1,05), Essigsäureäthylester, Glutathion, Kaliumdihydrogenphosphat, 2,6 Lutidin, Natriumacetat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydrogenphosphat, Natriumsulfat (wasserfrei), Perchlorsäure (d=1,67), Petroläther (Siedebereich 40 - 60 ^{o}C), Salzsäure (d=1,125), Schwefelsäure (d=1,84), Talk DAB 7, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Zinkazetat.

Spezialreagenzien:
DC Fertigplatten G 1500 Kieselgel, säurefest (Schleicher & Schüll, D-3354 Dassel), DC-Karten

SI Aluminiumfertigfolien (Riedel de Haen, D-3016 Seelze/Hannover), Ionenaustauschharz-Chromatographie - Doppelsäulen (Bio-Rad Laboratories, D-8000 München).
Porphobilinogen PBG (Porphyrin Products, Logan, Utah 84321/USA). Die Methylester von Uroporphyrin, Koproporphyrin und Protoporphyrin wurden aus porphyrischen Urinen und Faeces gewonnen.

Lösungen:

Äthylacetat/Essigsäure 3 + 1 (v+v)

Benzol/Äthylacetat/Methanol 85 + 13,5 + 1,5 (v+v+v)

Chloroform/Methanol 130 + 20 (v+v)

Diäthyläther/Petroläther 1 + 2 (v+v)

Ehrlich Reagenz: 3,0 p-Dimethylaminobenzaldehyd
+ 126 ml Essigsäure
+ 24 ml Perchlorsäure

1 N Essigsäure

0,2 N Essigsäure

Glutathion 0,1 mol/l

Kaliumdihydrogenphosphat 140 mmol/l

Methanol/Schwefelsäure 5 + 95 (v+v)

Natriumacetat 1 mol/l

PBG 1 mmol/l

Phosphat Puffer 135 mmol/l pH 7,65

1 N Salzsäure

0,5 N Salzsäure

Tris Puffer 50 mmol/l pH 7,4

Zinksulfat/Methanol/Chloroform 1,0 + 10 ml + 190 ml

b) Geräte

Dünnschichtchromatographiekammern (220 x 75 mm) (Camag, CH-4132 Muttens), runde Entwicklungskammern (200 x 100 mm) (Riedel de Haen, D-3016 Seelze/Hannover), diverse Eppendorf Pipetten (Netheler & Hinz GmbH, D-2000 Hamburg), Gefrierschrank (BBC, D-6800 Mannheim), Hochvakuumpumpen (RD 3 Fa. Brand, D-6980 Wertheim, BD4 Fa. Pfeiffer, D-6330 Wetzlar), Laborzentrifugen (Fa. Heraeus-Christ, D-3360 Osterrode), Lyophilisation (Liomatic 3, Fa. Lyoma, D-3400 Göttingen), Rotationsverdampfer (Rotavapor, Fa. Büchi, CH-9230 Flawil), Spektralphotometer Beckman DB-GT mit Schreiber, Spektrofluorometer Hitachi 203 (Fa. Perkin-Elmer, D-7770 Oberlingen), Schüttelgerät ("Super Mixer" Vertrieb Fa. Hörrle, D-6806 Viernheim), Trockenschrank (Fa. Memmert, D-8540 Schwabach), UV-Hochdrucklampe 366 nm (Desaga UV 131000, D-6900 Heidel-

berg), Wasserbad mit Thermostat (Fa. Köttermann, D-3165 Häningsen).

2. Untersuchunsmaterial

Als Untersuchungsmaterial diente Blut, Urin und Stuhl von Porphyrie-Patienten und Kontrollpersonen aus dem Universitätsklinikum Marburg und aus diversen Kliniken des In- und Auslandes. Im Krankengut befanden sich Patienten mit AIP, PV, HKP, EPP, CHP/PCT, sekundärer Koproporphyrinurie sowie chronischer und akuter Bleiintoxikation.

Dem Vollblut wurde 0,1 % Heparin als Antikoagulans zugesetzt. Das Blut wurde alsbald in der Laborzentrifuge 15 min bei 3000 U/min in Serum und Erythrozyten getrennt. Die Urin- und Stuhlproben wurden nicht konserviert, sondern lediglich kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

3. Biochemische Analytik der Porphyrine und Vorläufer

Die Bestimmung der Porphyrine in Urin, Faeces, Serum und Erythrozyten wurde mit der konventionellen Methode nach DOSS et al. durchgeführt (35, 36, 42, 49, 51, 52, 55). Da diese Methoden im Detail häufig beschrieben wurden, sollen an dieser Stelle nur die wichtigsten Analysenschritte erwähnt werden:

Nach Veresterung zu Methylestern werden die Porphyrine in Chloroform gelöst. Die Lösung wird gereinigt und quantitativ auf eine Dünnschichtplatte zur Trennung aufgetragen. Nach Entwicklung der Platte werden die entsprechenden Porphyrine getrennt und quantitativ mit dem Kieselgel von der Platte abgenommen. Die Porphyrine werden eluiert und spektrophotometrisch bestimmt.

Die Vorläufer ALS und PBG wurden mit der ebenfalls beschriebenen Methode nach DOSS et al. (60) bestimmt. Diese Analyse wird ionenaustauschchromatographisch durchgeführt. Dabei wird PBG direkt mit einem modifizierten Ehrlich-Reagenz

umgesetzt, während ALS vorher zu einem Monopyrrol zyklisiert wird. Der Ehrlich'sche Farbkomplex wird spektrophotometrisch gemessen (130).

Ein weiteres Verfahren, das in dieser Arbeit Anwendung findet, soll hier ebenfalls nur kurz beschrieben werden, da es früher aus diesem Laboratorium veröffentlicht wurde (162): Es handelt sich um die Auftrennung von Koprophorphyrin in seine Isomere I und III. Der mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennte Koproporphyrin-Methylester wird hydrolysiert und die freie Koproporphyrinsäure dünnschichtchromatographisch in einem Lutidin-Wasser-System in die Isomere I und III aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt analog der Porphyrinbestimmung spektrophotometrisch.

4. Enzymbestimmungen

4.1. Uroporphyrinogen-I-Synthase (URO-S)

Die Aktivität der URO-S wurde in den Erythrozyten bestimmt. Die Erythrozyten wurden durch dreimaliges wechselweises Einfrieren bei -30 °C und Auftauen bei Zimmertemperatur hämolysiert. Aus dem so gewonnenen Hämolysat wurde eine Verdünnung mit 50 mmol/l Tris Puffer (pH 7,4) im Verhältnis 1 : 10 bereitet und 100 µl davon zur Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzt.

Die Aktivitätsbestimmung der URO-S wurde in zwei methodischen Variationen durchgeführt: In der Serie A blieb die Erythrozytenverdünnung unbehandelt, d.h. sie wurde nicht erhitzt weiterverwendet; in der Serie B hingegen wurden die Folgeenzyme der URO-S, d.h. die URO-Cosynthase, die URO-D und die Koproporphyrinogenoxidase, durch Erhitzen bei 65 °C (Wasserbad) in 15 min. zerstört.

Nach Abkühlen der Proben im Eisbad wurde sowohl in Serie A wie in Serie B zu jedem Ansatz 10 µl PBG-Lösung (10^{-3}mol/l) zugesetzt. Diese Ansätze wurden in einem Trockenschrank bei 37 °C

eine Stunde lang inkubiert. Sofortiges Einfrieren bei -30 °C beendete die Inkubation.

Die synthetisierten Porphyrinogene sind Ausdruck der URO-S-Aktivität. Sie müssen aus dem Inkubationsansatz extrahiert und in Porphyrine oxidiert werden. Dazu wurde zum eingefrorenen Inkubat ein Gemisch von Aethylacetat/ Essigsäure (3+1, v+v; 1 ml) gegeben und bis zum völligen Auftauen umgeschüttelt. Nach Zugabe von Salzsäure (o,5 N; 4 ml) wurden die Porphyrine aus dem Inkubat ausgeschüttelt und extrahiert. Eine Trennung der wässrigen Phase von der organischen mußte abgewartet werden. Dann wurde die untere wässrige Salzsäure-Phase mit Hilfe einer Pasteurpipette abgezogen und anschließend durch Zentrifugieren (ca. 6000 U/min.) geklärt, d.h. die Zellreste wurden sedimentiert. Die Porphyrine hatten sich in diesem Extrakt gelöst und waren sowohl spektrophotometrisch gegen 0,5 N Salzsäure wie spektralfluorometrisch meßbar.

Die Auswertung der spektrophotometrischen Porphyrinbestimmung erfolgte durch Berechnen der korrigierten Extinktionen aus dem Soret-

Maximum der freien Porphyrinsäuren:

$$E_{korr} = 2 \cdot E_{max} - (E_{380} + E_{430}).$$

E_{korr} wurde mit dem Faktor F = 370 multipliziert. Dieser Faktor resultiert aus dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz:

$$c\ (\mu mol/l) = E_{korr} \cdot \frac{4}{0{,}541 \cdot 2 \cdot 0{,}01}$$

Daraus folgt: $c\ (\mu mol/l) = E_{korr} \cdot 370.$

Erläuterung:

4 = Extraktionsvolumen

2 = d (Küvettenschichtdicke in cm)

0,01 = 10 µl Erythrozyten

0,541 = Extinktionskoeffizient (nach FALK) (73 c)

Die parallele Bestimmung der Porphyrine im Spektrofluorometer erfolgte aus methodischen und diagnostischen Gründen. Hier handelt es sich um eine relative Bestimmung, wobei als Bezugsgröße die Porphyrinfluoreszenz bei Kontrollen dient.

Die Einheit der URO-S-Aktivität ist : U = µmol/l·h (URO).

4.2. Uroporphyrinogen-Decarboxylase (URO-D)

Die Aktivität der URO-D wurde wie die URO-S im Erythrozytenhämolysat bestimmt. Von diesem Hämolysat wurden zwei Verdünnungen bereitet: Verdünnung I mit Phosphatpuffer (135 mmol/l, pH 7,65) zur Vorinkubation und Verdünnung II mit Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (140 mmol/l) zur Hauptinkubation jeweils im Verhältnis 1:5.

Zur Vorbereitung der Vorinkubation wurden 500 ul der Verdünnung I bei 65 °C 15 min im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurde zu jedem Ansatz 10 µl Glutathion-Lösung (0,1 mol/l) und 30 µl PBG-Lösung (1 mmol/l) gegeben. Dieser Ansatz inkubierte eine Stunde bei 45 °C im Wasserbad unter Ausschluß von Lichteinwirkung. Nach Beendigung der Vorinkubation wurde der Testansatz im Eisbad abgekühlt, 500 µl der Verdünnung II hinzugegeben und sofort danach im Wasserbad von 37 °C eine Stunde lang erneut inkubiert (Hauptinkubation). Diese Hauptinkubation wurde durch Einfrieren

bei -30 °C beendet. Anschließend wurde der eingefrorene Ansatz lyophilisiert und, wie unter Abschnitt B. I. 3. erwähnt, zur dünnschichtchromatographischen Porphyrinanalyse weiter aufgearbeitet. Zur Auswertung der URO-D wurde das dünnschichtchromatographisch isolierte KOPRO als Methylester im Spektrophotometer gemessen (siehe B. I. 3.).
Die Einheit der Aktivität der URO-D ist: U = µmol/l·h (KOPRO).

II. Methodendiskussion

1. Uroporphyrinogen-I-Synthase

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Methode beruht auf einer Inkubation von Erythrozytenhämolysat. Die erythrozytäre URO-S setzt das Substrat PBG in URO'gen I um, das spontan und unter den angewandten Analysengängen zum URO quantitativ oxidiert. Dieses Grundprinzip zur Bestimmung der URO-S-Aktivität wurde bislang von verschiedenen Untersuchern zur Bestimmung der URO-S genutzt (Tab. 3.). Einerseits bestimmen die meisten Autoren die URO-S im Vollblut oder in Erythrozyten, andererseits bevorzugen andere Lebergewebe oder Fibroblasten als Untersuchungsgut. Gerade die Leber als ein wichtiges Syntheseorgan für Häm und Hämprä-kursoren würde sich für die Bestimmung der URO-S anbieten, jedoch bereitet die Durchführung in größerem Rahmen Schwierigkeiten. Aus diesem Grunde hat sich als Probematerial zur Untersuchung der URO-S Blut oder Erythrozyten durchgesetzt. Dieses Material läßt sich leicht standardisieren, braucht nicht homogenisiert zu werden und ist leicht zugänglich.

ab. 3 Methoden zur Bestimmung der URO-S-Aktivität

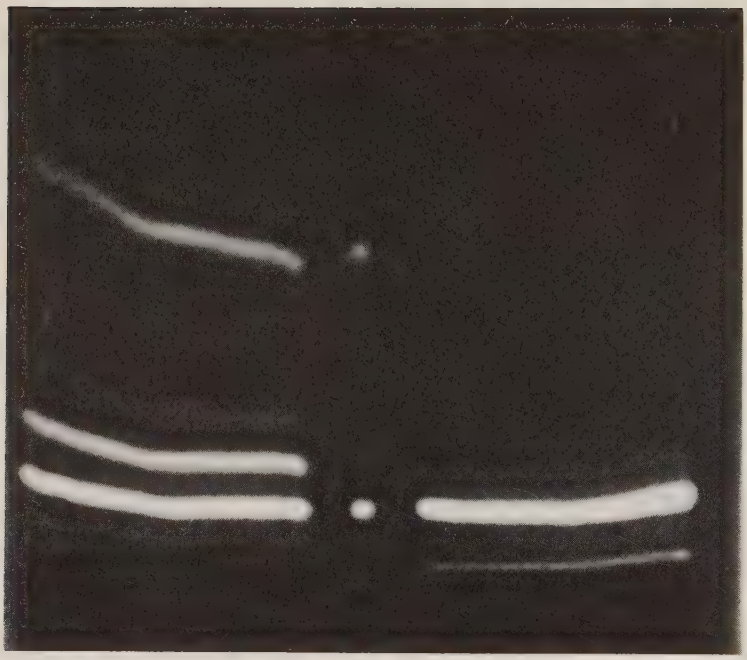
utor(en)	Lit.Nr.	Methode	Probe	Substrat	Bestimmung und Auswertung	Einheit der URO-S
ASSA et al	158	Mikro	Blut	PBG	Schnellextraktion von URO Äthylacetat/Essigsäure, 0,5 N HCL	nmol/ml/h URO
AGNUSSEN et al	126	Makro	Ery	PBG	Perchlorsäure-Oberstand fluorometrisch gegen KOPRO	nmol/ml/h Porphyrine
REIMER-BIRNBAUM	114 115 116	Mikro	Blut/Ery	PBG	Schnellextraktion Äthylacetat/Essigsäure, 0,5 N HCL	pmol/mg Prot./h Porphyrine
RAND et al	187	Makro	Ery/Leber	PBG	Perchlorsäure-Oberstand a) DC b) Gesamtporphyrine fluorometrisch	pmol/mg Prot/h URO
EYER et al	134	Makro	Ery	PBG	Perchlorsäure/Methanol - Oberstand fluorometrisch	pmol/mg Prot/h URO
USTAJOKI	136	Makro	Ery	PBG	Perchlorsäure-Oberstand fluorometrisch gegen KOPRO	pmol/mg Prot/h URO
LANDCHAMP et al	87	Makro	Ery	PBG	Schnellextraktion Äthylacetat/Essigsäure	pmol/mg Prot/30 URO min
TERSON et al	145	Makro	Blut	ALS	TCA-Oberstand fluorometrisch gegen KOPRO	nmol/ml/h KOPRO
NKOWSKY et al	14	Makro	Fibro-blasten	PBG	TCA, Äthylacetat/Essigsäure, 3 N HCL fluorometrisch gegen KOPRO	pmol/mgProt/3h Porphyrine
SS, v. TIEPERMANN	64	Mikro	Ery	PBG	Schnellextraktion Äthylacetat/Essigsäure, 0,5 N HCL	umol/l/h URO

Eine methodische Variationsmöglichkeit zur Bestimmung der URO-S liegt in der Größenordnung der Ansatzvolumina. So werden Mikro- und Makromethoden beschrieben. Die unterschiedlichen Volumina bedingen jeweils veränderte Arbeitsmethoden, die mit jeweils anderen Porphyrinbestimmungsmethoden verbunden sind. Vor Jahren in unserem Marburger Arbeitskreis durchgeführte Synthesestudien an Erythrozyten (41, 59, 163) ließen Aussagen über die Aktivität der URO-S zu. Jene Methoden wurden im Makro-Maßstab durchgeführt und mußten dünnschichtchromatographisch ausgewertet werden. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Methode kann als Mikromethode bezeichnet werden und zeichnet sich unter Umgehung der Dünnschichtchromatographie durch eine schnell durchzuführende Extraktion mit anschließender Porphyrinbestimmung aus. Sie wurde entwickelt durch Kombination und Variation anderer Methoden zur Bestimmung der URO-S (87, 115, 133, 158).

Wie in B. I. 4. 1. beschrieben, wurde die Bestimmung in zwei methodischen Variationen durchgeführt. In der Serie A wurde die Erythrozytenverdünnung nicht vor der Inkubation

auf 65 °C erhitzt; in Serie B wurde vorher 15 min bei 65 °C erhitzt. Mehrere Autoren beschreiben die URO-S als hitzestabil (12, 121) und die Folgeenzyme URO'gen Cosynthase und URO'gen Decarboxylase als hitzelabil (153). Aus diesem Grunde ist in der Serie B nach Zerstören der Folgeenzyme nur die URO-S aktiv geblieben und synthetisiert aus PBG URO'gen I. In der Serie A dagegen sind die Folgeenzyme auch aktiv und synthetisieren neben URO'gen I auch URO'gen III und die decarboxylierten Porphyrinogene mit sieben bis vier Carboxylgruppen. Die Abb. 2 zeigt die Syntheseprodukte in dünnschichtchromatographischer Auswertung.

Aus diesen Oberlegungen heraus ist der Methode B der Vorzug zu geben, wenn die Aktivität speziell der URO-S bestimmt werden soll. Die Aktivität dieses Enzyms hat ihren Ausdruck in der synthetisierten Menge URO'gen I, das oxidiert in der beschriebenen Extraktionsmethode voll erfaßt und bestimmt wird. In der Methode A hingegen sind die Folgeenzyme der URO-S weiterhin aktiv. Sie bewirken in der Inkubation neben der Synthese von URO'gen auch die der anderen Porphyrinogene. Diese können



A B

Abb. 2: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Syntheseprodukte der URO-S:
A: Methode A
B: Methode B

mit der beschriebenen Extraktion zwar auch zum Teil erfaßt, aber nicht differenziert werden. Frühere Untersuchungen (163) mit dünnschichtchromatographischer Trennung der synthetisierten Porphyrine haben gezeigt, daß bei intakten Enzymen als Hauptkomponente URO'gen synthetisiert wird, gefolgt von KOPRO'gen und HEPTA'gen. Da die unterschiedlichen Porphyrine verschiedene Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte haben, muß in Obereinstimmung mit dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz die photometrische Bestimmung der Methode A einen Fehler beinhalten.

Die hier beschriebene Methode erweist sich trotz obiger Einschränkungen für die Anwendung im spezialdiagnostischen Labor doch recht brauchbar. Das veranschaulicht die Tabelle, in der die Präzision der Bestimmung angegeben wird. Alle Variationskoeffizienten liegen unter 10 %. Wenn man bedenkt, daß für enzymatische Routinebestimmungen im klinisch-chemischen Labor eine relative Standardabweichung (VK) von 10 % noch toleriert wird (150), dann sind beide

Methoden durchaus für diagnostische Untersuchungen brauchbar. Der Vergleich der Variationskoeffizienten der Methode A mit B unterstreicht jedoch auch hier die oben erwähnte Bevorzugung der Methode B.

Tab. 4 Präzision der Bestimmung der Uroporphyrinogen-Synthase (µmol/l·h) von Woche zu Woche (I) und in der Serie (II) (n = 8).

	A	B
I	64,9 ± 6,3	66,1 ± 4,2
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
	Bereich 55-74	Bereich 61-73
	VK% = 9,7	VK% = 6,4
II	53,7 ± 2,3	59,2 ± 1,8
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
	VK% = 4,3	VK% = 3,0

2. Uroporphyrinogen-Decarboxylase

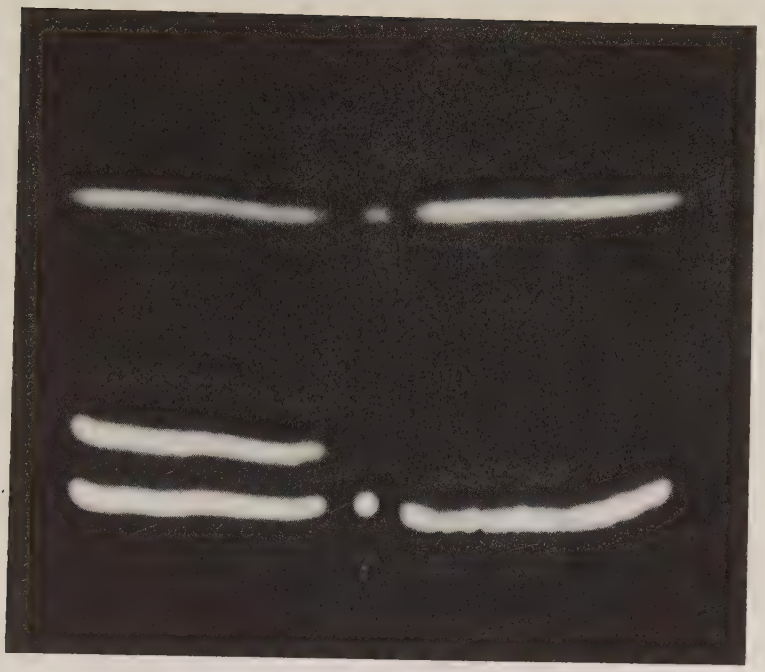
Die hier beschriebene Bestimmung der URO-D-Aktivität hat die Erfassung der Decarboxylierung von URO'gen zu KOPRO'gen zum Prinzip. Die Decarboxylierung verläuft über die Stufen HEPTA'gen, HEXA'gen und PENTA'gen sowohl für die Isomerenreihen I wie III. Einige Autoren sind der Auffassung, für alle diese Decarboxylierungsschritte sei nur ein Enzym verantwortlich, die URO-D (23, 153, 201).

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode geht vom Erythrozytenhämolysat aus. Analog der URO-S Bestimmung muß auch hier aufgezeigt werden, daß eigentlich Lebergewebe wesentlich geeigneter wäre, aber, wie oben ausgeführt, ist zur diagnostischen Anwendung eine Methode sinnvoll, wenn das Probematerial gut meßbar ist und damit eine Standardisierung erleichert.

Zur Bestimmung der URO-D-Aktivität werden verschiedene Wege beschritten. In unserem Marburger Arbeitskreis wurden bisher haemolysierte Erythrozyten mit PBG inkubiert (163), die synthetisierten Porphyrine dünnschichtchromatographisch

getrennt und ausgewertet. Eine Aussage über die URO-D-Aktivität wurde nur anhand der relativen Mengenverhältnisse zwischen URO, HEPTA und KOPRO getroffen. Relative Ergebnisse zeigen zwar den Enzymdefekt an, sind jedoch enzymologisch schwer auszuwerten. Aus diesem Grunde wurde die hier beschriebene Methode nach ROMEO und LEVIN (153) variiert. In Abb. 3 sind die dünnschichtchromatographischen Auftrennungen der Inkubationsprodukte der bisherigen Methode im Vergleich zu der hier beschriebenen photographisch dokumentiert.

Das Hauptproblem ist die Bereitung des URO'gens als Substrat für die Aktivitätsbestimmung der URO-D (Tab. 5.). ROMEO und LEVIN (153) gewinnen das Substrat aus PBG und gereinigter isolierter URO-S. Dieses Verfahren ist zwar gut, bringt aber die Schwierigkeit der vorherigen Isolierung und Reinigung der URO-S mit sich. Diese Schwierigkeit ist in der hier beschriebenen Methode umgangen worden, indem die erythrozytäre URO-S benutzt wurde. Nach CHEN und MILLER (26) zeigt die URO-D in der Kinetik mit den Isomeren I und III des URO'gen als Substrat unterschiedliche Synthe-



A B

Abb. 3: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Syntheseprodukte der URO-D:
A: frühere Inkubationsmethode
B: in dieser Arbeit durchgeführte Methode

Tab. 5 Methoden zur Bestimmung der URO-D-Aktivität

Autor(en)	Lit.Nr.	Probe	Substrat	Gewinnung des Substrates	Bestimmung	Einheit der URO-D
ROMEO et al	153		a) URO'gen I b) URO'gen III	PBG+gereinigte URO-S PBG+gereinigte URO-S+CoS	Schnell-extraktion	µmol/l·h KOPRO
KUSHNER et al	119	Ery/Leber	a) URO'gen I b) URO'gen III	$H3_{PBG}$ (siehe ROMEO)	a) Schnell-extraktion b) DC	µmol/l/h HEPTA-KOPRO
BLECKENHORST et al	8	Ery	URO'gen I	$14C_{PBG}$+gereinigte URO-S	DC	nmol/h/mg Hb
v. TIEPERMANN		Ery	URO'gen I	PBG + Vorinkubation	DC	µmol/l/h KOPRO
ELDER et al	71	Leber	PENTA'gen		HPLC	nmol/h/g Leber KOPRO

seraten. Diese Beobachtung wurde mit der aus Tabakblättern isolierten und gereinigten URO-D gemacht; die Beobachtung bleibt jedoch nicht unwidersprochen, denn einige Autoren (119, 153) sind der Meinung, beide Isomere unterscheiden sich nicht als Substrat der URO-D. Dieses trifft in Übereinstimmung mit CHEN und MILLER (26) für Inkubationszeiten bis maximal 30 min zu, für größere Inkubationsdauer stellen diese jedoch deutliche Unterschiede fest. In der vorliegenden Methode wurden die Erythrozyten auf 65 ^{o}C erhitzt, um die Folgeenzyme der URO-S zu denaturieren, so daß als Substrat in der Vorinkubation nur URO'gen I synthetisiert werden konnte.

Eine andere Möglichkeit zur Gewinnung von URO'gen als Substrat wäre die Reduktion von URO mit Hilfe von Natriumamalgan (73 b). Dieses rein chemische Verfahren ist aufwendig und erfordert die getrennten Isomere von URO I und III.

Die Auswertung der URO-D-Bestimmung erfolgt dünnschichtchromatographisch. Eine solche Porphyrinbestimmung ist zwar aufwendig, bei dieser Methode jedoch spezifisch. Die Aktivität der URO-D wird ausgedrückt anhand der Menge an synthetisiertem KOPRO'gen (µmol/l·h), welches

zu KOPRO oxidiert. Das Chromatogramm weist neben KOPRO noch eine bedeutende Menge URO, das z.T. aus der Vorinkubation stammt, auf. Eine einfache Extraktion, wie sie von anderen Autoren durchgeführt wird, erfaßt wahrscheinlich noch Anteile dieses URO. Die Dünnschichtchromatographie trennt URO und KOPRO. Die Identifikation des Syntheseproduktes der URO-D, KOPRO, wird durch Bestimmung der Extinktionsmaxima des KOPRO-Methylesters in Chloroform bestätigt: das Soretmaximum liegt bei 400 nm, die Nebenmaxima bei 498, 532, 566, 594 und 621 nm (73 c). Die Präzision der Bestimmung verdeutlicht, daß auch sie klinisch-chemischen Kriterien der Gegenwart genügt.

In der folgenden Tabelle ist die relative Standardabweichung (VK) in der Bestimmung von Tag zu Tag mit 8,9 % und in der Serie mit 3,7 % angegeben. Beide Werte liegen damit in einem Bereich, der für enzymatische Bestimmungen üblich ist (150).

Tab. 6 Präzision der Bestimmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (KOPRO µmol/l·h) von Woche zu Woche (I) und in der Serie (II).

I. $19{,}1 \pm 1{,}7$ ($\bar{x} \pm s$)

n = 8

VK % = 8,9

Bereich: 17,1 - 21,5

II. $18{,}8 \pm 0{,}7$ ($\bar{x} \pm s$)

n = 8

VK % = 3,7

Bereich: 18,0 - 19,8

C. METHODISCHE ERGEBNISSE

I. Uroporphyrinogen-I-Synthase

Die Methode zur Bestimmung der URO-S wird als Mikromethode durchgeführt. Die Menge der eingesetzten Probe ist insofern von Bedeutung, als einerseits ein zu geringer Einsatz von Erythrozyten den Analysenfehler vergrößert und damit die Reproduzierbarkeit der Methode verringert, andererseits bei größerer Menge durch ihren Hämoglobingehalt störend auf die Porphyrinbestimmung einwirken kann. In Abb. 4 wird gezeigt, daß sowohl in der Methode A wie in B die gefundenen Porphyrine mit der Erythrozytenkonzentration bis zu 10 µl/100 µl linear ansteigen. Bis zu 30 µl/100 µl Erythrozytenkonzentration weichen die Porphyrine gering von einem linearen Anstieg ab. Bei 40 µl/100 µl ist der Einfluß der Erythrozyten auf die Porphyrinbestimmung übermäßig, so daß die Bestimmung nicht mehr aussagefähig ist.

Enzyme sind in ihrer Aktivität vom pH-Wert abhängig. In Abb. 5 wird das pH Optimum der URO-S mittels der Porphyrinsynthese aufgezeigt. In der Methode B, nach Zerstören der Folgeenzyme der URO-S,

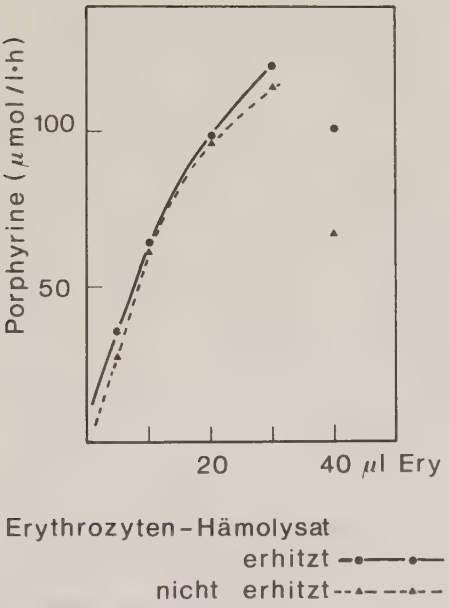


Abb. 4: Bestimmung der optimalen Erythrozytenmenge im Inkubationsansatz zur URO-S

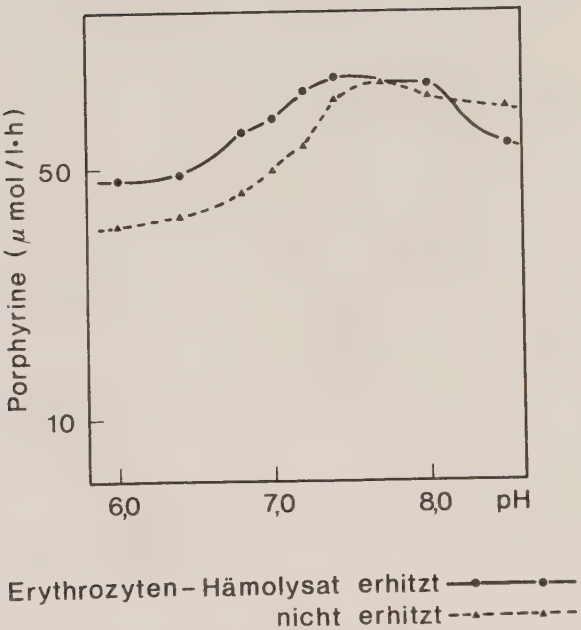


Abb. 5: Bestimmung des optimalen pH-Wertes im Inkubationsansatz zur URO-S

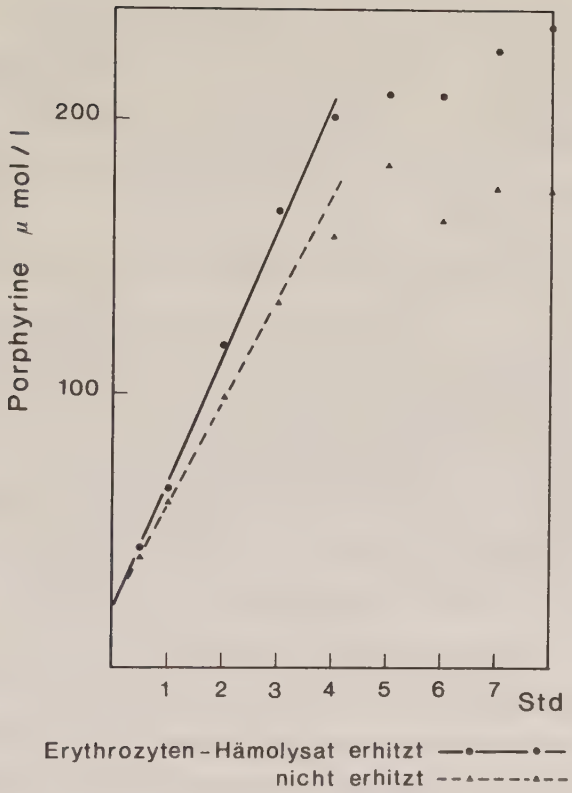


Abb. 6: Enzymkinetik in der URO-S

liegt das pH Optimum bei pH 7,4, also dem Wert unserer Pufferlösung. In Methode A ist das pH Optimum nach pH 7,7 verschoben. Diese Verschiebung ist vermutlich durch die uneinheitliche Enzymzusammensetzung (URO-S und Folgeenzyme) verursacht worden.

Enzymkatalysierte Reaktionen sind unter anderem abhängig von der Reaktionsdauer. Bei gesättigter Substratkonzentration steigt das Reaktionsprodukt linear mit der Reaktionszeit. Die Kinetik der URO-S (Abb. 6) zeigt für die Methode A einen linearen Anstieg der Syntheseleistung bis zu 3 Stunden. Die Bestimmung der Regressionskonstanten aus den Einzelwerten ergibt für diese Reaktionsdauer den Idealwert $r = 1,0$. In der Methode B bleibt der Anstieg der Syntheseleistung bis zu 4 Stunden linear ($r = 1,0$). Die Regressionskonstante für einen Reaktionszeitraum von 4 Stunden in der Methode A weicht gering vom Idealwert ab ($r = 0,98$). Bei längerer Reaktionsdauer stagniert die Porphyrinsynthese in beiden Methoden. Die Enzymreaktion ist nicht mehr substratgesättigt.

Die Kinetik der URO-S zeigt deutlich, daß unter den hier beschriebenen Bedingungen (B.I.4.1.) in beiden Methoden a) die Inkubationsdauer von

1 Stunde und b) die angebotene Substratkonzentration (PBG) für eine Bestimmung der URO-S-Aktivität geeignet sind. Die Beobachtung eines linearen Anstiegs der Porphyrinsynthese in einer Reaktionszeit bis zu 3 Stunden zeigt außerdem eine große Substratreserve, die unter diesen Bedingungen auch die Bestimmung höherer Enzymaktivitäten zuläßt.

Die Aktivität der URO-S im Erythrozytenhämolysat von Kontrollpersonen wurde sowohl mit intakten Folgeenzymen der Hämbiosynthesekette (Methode A) als auch nach deren Inaktivierung (Methode B) studiert. Dabei fällt auf, daß die Porphyrinsynthese in Methode B geringgradig höher als in Methode A ist.

Methode	A	B
$\bar{x} \pm s$	61,0 ± 11,6	64,7 ± 12,7
n	302	274

Wie unter B. II. 1. ausgeführt, werden in der Methode A sämtliche Porphyrinogene von URO'gen bis KOPRO'gen synthetisiert, in Methode B dagegen nur URO'gen.

Die zahlenmäßig etwas höhere Porphyrinsynthese in Methode B ist damit zu erklären, daß nur URO synthetisiert und durch die Extraktionsmethode erfaßt wird, während in Methode A ein Teil des durch die URO-S synthetisierten URO'gens mit Hilfe der intakten Folgeenzyme decarboxyliert und in der Extraktion nicht voll erfaßt wird.

Die Porphyrinbestimmung im HCl-Extrakt wurde sowohl spektrophotometrisch als auch spektrofluorometrisch durchgeführt. Eine photometrische Bestimmung der Extinktion erlaubt nach dem Gesetz von LAMBERT-BEER eine absolute Konzentrationsangabe der Porphyrine. Die fluorometrische Bestimmung dagegen läßt nur relative Angaben zu, ist jedoch empfindlicher. Einige Autoren werten diese Bestimmung durch Vergleich mit einem KOPRO-Standard aus (14, 126, 136, 145, 187). In der Abb. 7 ist das relative fluorometrische Ergebnis (%) gegen das absolute photometrische (µmol/l·h) in Relation gebracht worden. Die Regressionsgerade hat einen Anstieg von 1,24 (Idealfall 1,0) und einen Ordinatenschnittpunkt bei - 5,75 (Idealfall 0). Der Regressionskoeffizient ist r = 0,89 (Idealfall 1,0). Die Verteilung der einzelnen Meßpunkte zeigt eine zunehmende Streuung in höheren

Porphyrinkonzentrationen. Eine signifikante Differenz ist jedoch nicht festzustellen.

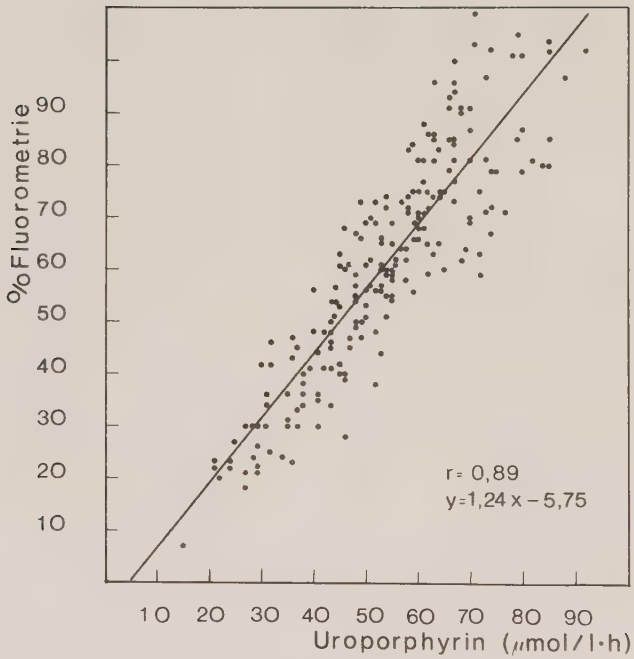


Abb. 7: Vergleich der spektrofluorometrischen und spektrophotometrischen Auswertung der Syntheseprodukte in der URO-S

II. Uroporphyrinogen-Decarboxylase

Der kritische Schritt der URO-D Bestimmung ist die Bereitung des Substrats. In der hier beschriebenen Methode (B. I. 4. 2.) wird als Substrat URO'gen I in einer Vorinkubation aus Erythrozytenhämolysat gewonnen.

In Abb. 8 a) wird der Einfluß der Vorinkubationsdauer auf die in der Hauptinkubation synthetisierte Menge KOPRO'gen dargestellt. Dabei zeigt sich eine maximale Synthese nach 30 min Vorinkubation und ein auffälliger Abfall nach 2 Stunden. Der relative Anteil des Isomer I am Gesamtkoproporphyrin nimmt mit der Inkubationsdauer zu (Abb. 8 b). Während die Gesamtmenge an KOPRO nach 30 min Inkubationsdauer maximal ist, beträgt der Anteil an Isomer I zu dieser Zeit nur ca. 53 %. Der Isomer I-Anteil erreicht nach einer Stunde Inkubation, der Dauer unserer Methode, ca. 87 %, die Gesamtmenge an KOPRO ist zu diesem Zeitpunkt ca. 20 µmol/l. Eine längere Inkubationsdauer würde zwar den Isomer I-Anteil noch steigern, geht aber erheblich zu Lasten der Gesamtmenge an KOPRO.

Eine Bestimmung des Substrates der Vorinkubation, PBG, zeigt im Verlauf der Inkubationszeit eine deutliche Abnahme in der ersten Stunde (Abb. 9). Die nach

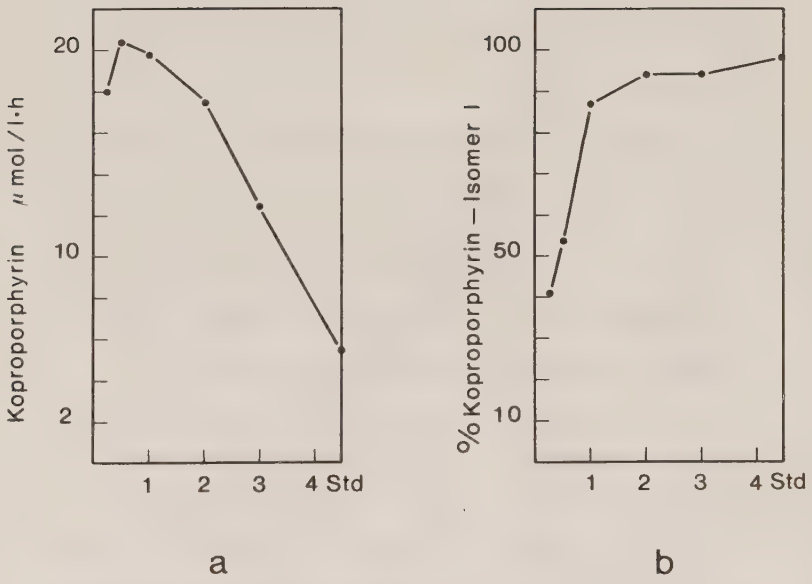


Abb. 8: Kinetische Studien zur Vorinkubation in der URO-D anhand der Auswertung der Syntheseleistung des Systems in der Hauptinkubation.

a) Synthese von KOPRO in der Hauptinkubation

b) Relative Anteile von KOPRO-Isomer I in der Hauptinkubation

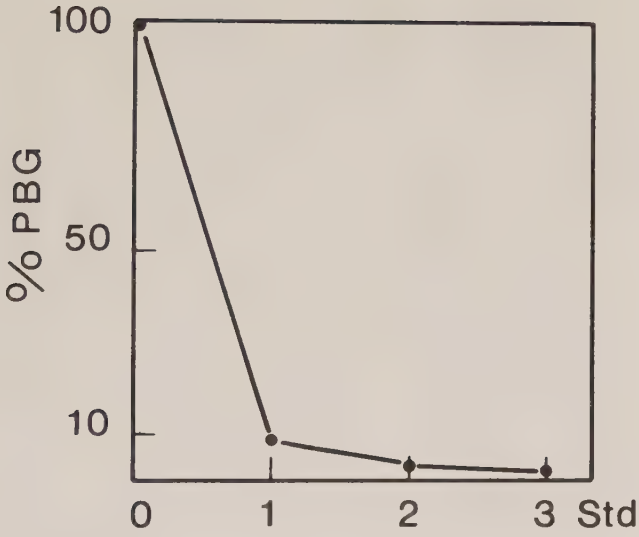


Abb. 9: Substratabnahme im Verlauf der Vorinkubation zur URO-D

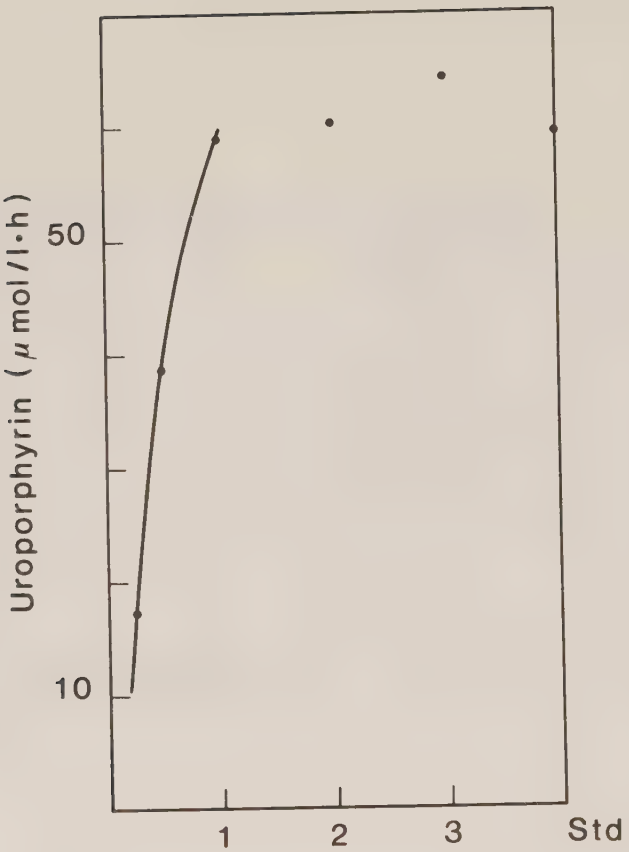


Abb. 10: Kinetik der Synthese von URO'gen in der Vorinkubation zur URO-D.
Bestimmung nach Umsatz zu URO

einer Stunde zur weiteren Synthese verbleibende PBG-Konzentration ist geringer als 10 % der Ausgangskonzentration. Das hat ein Sistieren der URO-Synthese zur Folge. Die Abb. 10 zeigt deutlich eine fast lineare Zunahme der URO-Konzentration in der ersten Stunde der Inkubation und eine Stagnation im weiteren zeitlichen Verlauf.

Zum Schutz vor Oxydation des synthetisierten Substrates URO-I wird dem Vorinkubationsansatz reduziertes Glutathion zugesetzt. Untersuchungen mit höheren Konzentrationen dieses Reduktionsmittels zeigten bei der Auswertung der URO-D Bestimmung im Dünnschichtchromatogramm neben den üblichen Porphyrinen eine enorme Menge PROTO (ca. 1 mmol/l). Versuche mit einem anderen, auch hoch konzentriertem Reduktionsmittel, Ascorbinsäure, ergaben ähnliche Ergebnisse. Bei Verringerung der Glutathionkonzentration auf 1 µmol/l traten diese Artefakte nicht auf. Die Erklärung dieser Befunde ist in der hohen Konzentration der Reduktionsmittel zu finden. So kann in Übereinstimmung mit FALK (73 a) das Eisen aus dem Häm gelöst werden und PROTO wird frei.

In Abb. 11 wird die Kinetik der URO-D in der Hauptinkubation dargestellt. Die Menge des synthetisierten KOPRO'gens als Ausdruck der Enzymaktivität

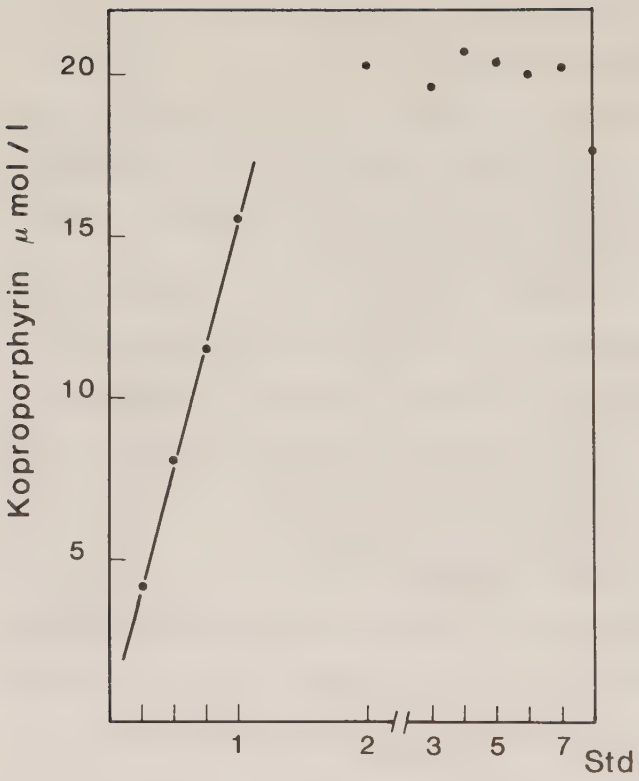


Abb. 11: Enzymkinetik der URO-D:
Synthese von KOPRO in der Hauptinkubation

zeigt im Verlauf der ersten Inkubationsstunde einen linearen Anstieg. Im weiteren zeitlichen Verlauf steigt die Synthese leicht an, um nach 2 Stunden zu stagnieren. Analog den Ausführungen unter B. II. 2. wird hier deutlich, daß in unserer Methode die Hauptinkubationsdauer von einer Stunde durchaus für die Enzymbestimmung geeignet ist. Die Substratreserve ist zwar nicht groß, um übermäßig hohen Enzymaktivitäten eine gesättigte Substratkonzentration anbieten zu können, in einer kürzeren Inkubationszeit dagegen würden aber zu geringe Mengen KOPRO synthetisiert, um eine optimale Auswertung zu ermöglichen.

D. ANWENDUNG DER ENZYMBESTIMMUNGEN IN DER BIOCHEMISCHEN DIAGNOSTIK VON PORPHYRIEN.

I. Uroporphyrinogen-I-Synthase

Die URO-S-Aktivität wurde in Erythrozytenhämolysat von 380 Patienten bestimmt, unter denen sich 21 mit klinisch manifester akuter intermittierender Porphyrie befanden. Der Normalbereich einer Stichprobe lag bei 61 ± 11,6 µmol/l·h URO ($\bar{x}$ ± s, n=302) in der Methode A und bei 64,7 ± 12,7 µmol/l·h URO ($\bar{x}$ ± s, n=274) in der Methode B. Die Durchschnittsaktivität der URO-S bei Patienten mit AIP und deren Verwandte betrug 35,0 ± 6,4 bzw. 39,8 ± 9,0 µmol/l·h URO ($\bar{x}$ ± s, n=50) und war damit signifikant ($p < 0{,}001$) gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Dieser Befund entspricht einer relativen Aktivität von 57 %, bzw. 61 % der Kontrollen. Die Abb. 12 zeigt die Verteilung der URO-S-Aktivität von AIP Patienten und Kontrollen in der Methode A.

Bei den 21 Fällen von AIP war die Diagnose bereits aufgrund der charakteristischen Konstellation der Porphyrinvorläufer- und Porphyrinausscheidung im Urin gestellt worden. Sowohl bei 7 der 21 Fälle von

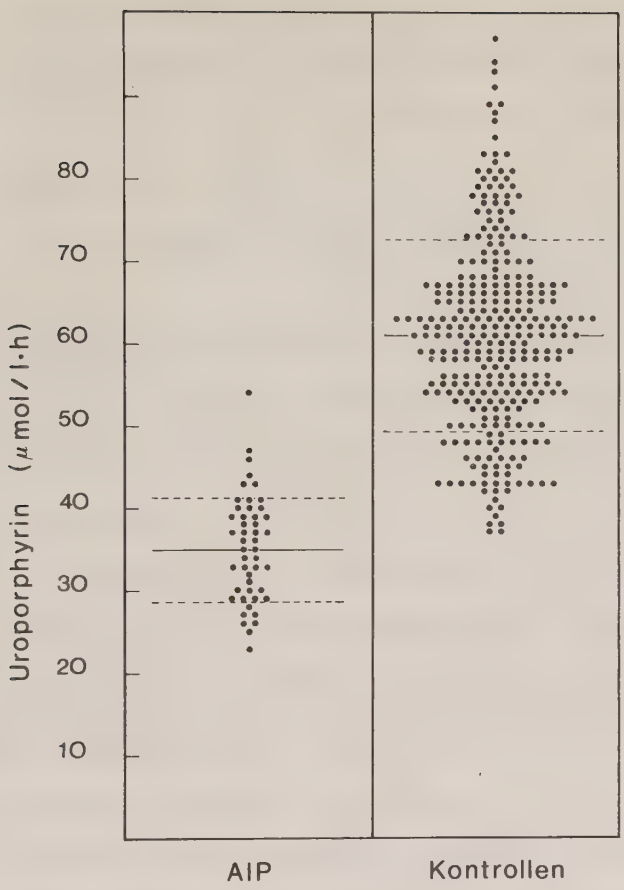


Abb. 12: Verteilung der URO-S-Aktivität in Erythrozyten bei Patienten mit AIP und Kontrollen

AIP als auch bei 6 Verwandten der Erkrankten lag die URO-S-Aktivität in der Oberlappungszone (40 - 50 µmol/l·h). Bei 32 Verwandten von 9 Patienten mit AIP war die Aktivität der URO-S in 22 Fällen signifikant erniedrigt, von denen 7 einen pathologischen Porphyrin- und Vorläuferbefund im Urin aufwiesen.

Diese Befunde zeigen einerseits die deutliche Erniedrigung der URO-S-Aktivität sowohl bei AIP Patienten als auch deren Verwandten, andererseits aber auch eine gewisse "Grauzone" in der URO-S-Aktivität zwischen AIP Patienten und Kontrolle. Die "Grauzone" bringt für eine AIP-Diagnose allein aus der Enzymbestimmung gewisse Unsicherheiten mit sich. Man kann zwar aus den vorliegenden Enzymstudien schließen, daß eine Erniedrigung der URO-S-Aktivität um 30 % gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen als Hinweis für das Vorliegen eines genetischen enzymatischen Defektes bei der AIP anzusehen ist, eine Urinanalyse bleibt jedoch unumgänglich.

Die AIP kann je nach dem Grad ihrer klinischen und pathobiochemischen Manifestation in verschiedene Phasen eingeteilt werden (siehe E. I.) (64, 108).

Tab. 7 Bestimmung der Uroporphyrinogen-I-Synthase µmol/l·h) in Erythrozyten von Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie (AIP) und deren Familienangehörige.

A	B
I AIP:Enzymdefekt	
32,9 ± 5,7	37,7 ± 7,8
($\bar{x}$ ± s, n = 21)	($\bar{x}$ ± s, n = 21)
Bereich 23-43	Bereich 24-48
II AIP:Latente Phase	
37,3 ± 6,6	43,6 ± 9,9
($\bar{x}$ ± s, n = 19)	($\bar{x}$ ± s, n = 19)
Bereich 27-50	Bereich 24-57
III AIP:Manifeste Phase	
37,0 ± 7,6	40,8 ± 10,9
($\bar{x}$ ± s, n = 10)	($\bar{x}$ ± s, n = 10)
Bereich 24-48	Bereich 21-57
I-III 35,0 ± 6,4 ($\bar{x}$ ± s)	I-III 39,8 ± 9,0 ($\bar{x}$ ± s)
= 57,4 % von $\bar{x}$ der Kontrollen	= 64,7 % von $\bar{x}$ der Kontrollen
Kontrollen $\bar{x}$ = 61	Kontrollen $\bar{x}$ = 65
$p < 0,001$	$p < 0,001$

Das Ausmaß der Erniedrigung der URO-S-Aktivität ist nach unseren Untersuchungen nicht von den Phasen der AIP abhängig. Sowohl in der Phase des genetischen Defektes als auch in der Latenzphase und in der Manifestationsphase werden die enzymatischen Aktivitäten als gleichrangig verändert gefunden (Tab.7.).

Die AIP zählt zu den hereditären Stoffwechselerkrankungen. Es kann als gesichert angesehen werden, daß bei dieser Erkrankung ein genetischer Defekt im Stoffwechsel des Porphobilinogens zum URO'gen vorliegt. Dieser Schritt wird durch die URO-S katalysiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität gibt somit Aufschluß über das Vorliegen des genetischen Defektes gerade in Familienstudien. Bei Auftreten einer gesicherten AIP haben wir die Familienangehörigen der Patienten untersucht. Anhand der Urinanalysen und enzymatischer Studien konnten wir über Generationen den genetischen Defekt und damit die Veranlagung zur AIP nachweisen (120). Obwohl wir bei den Familienangehörigen selten klinische Symptome beobachten konnten, stellten wir doch neben einem URO-S-Defekt oftmals pathologische Porphyrin- und Vorläuferausscheidungen im Urin fest.

In den folgenden Genealogien (Abb. 13 - 19) soll veranschaulicht werden, wie die einzelnen Familien-

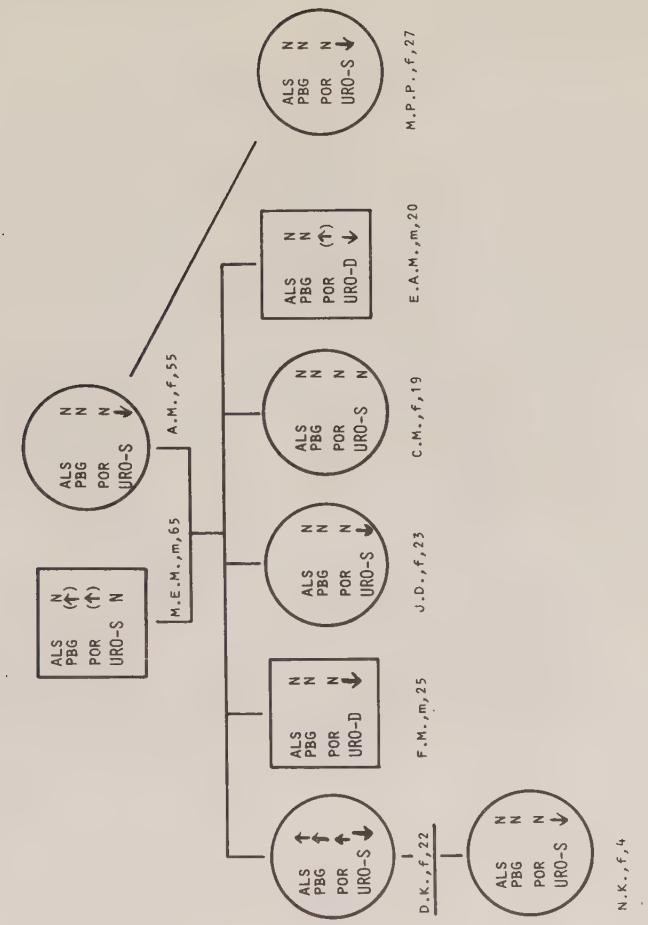


Abb. 13: Untersuchung der Familie der
AIP-Patientin D.K.,f,22

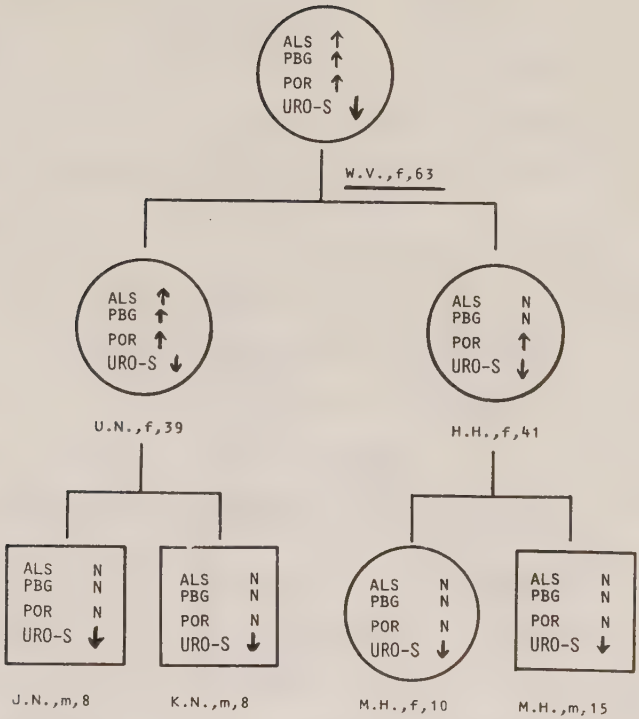


Abb. 14: Untersuchung der Familie der AIP-Patientin W.V.,f,63

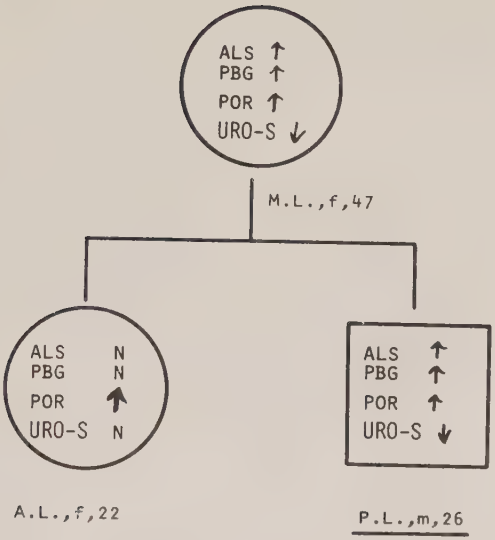


Abb. 15: Untersuchung der Familie des AIP-Patienten P.L.,m,26

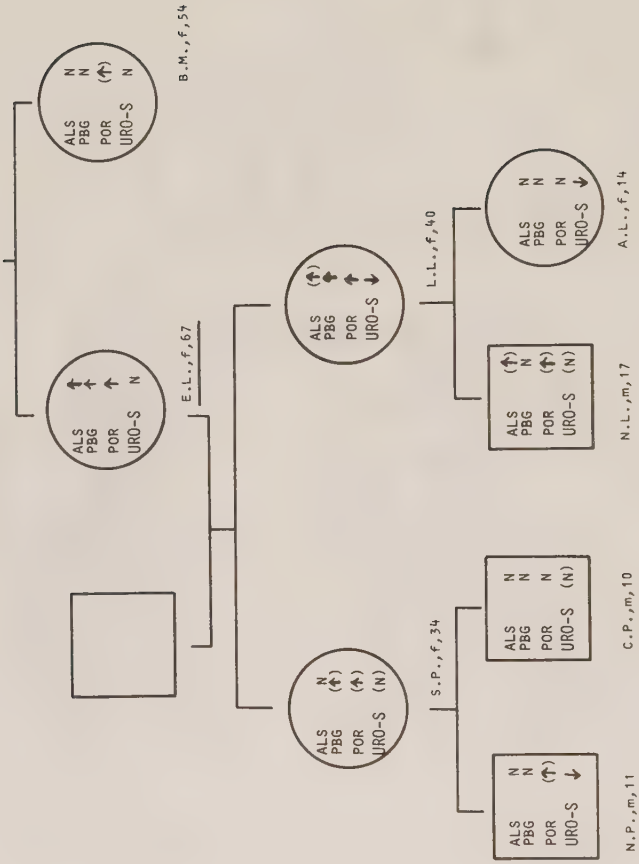


Abb. 16: Untersuchung der Familie
der AIP-Patientin E.L.,f,67

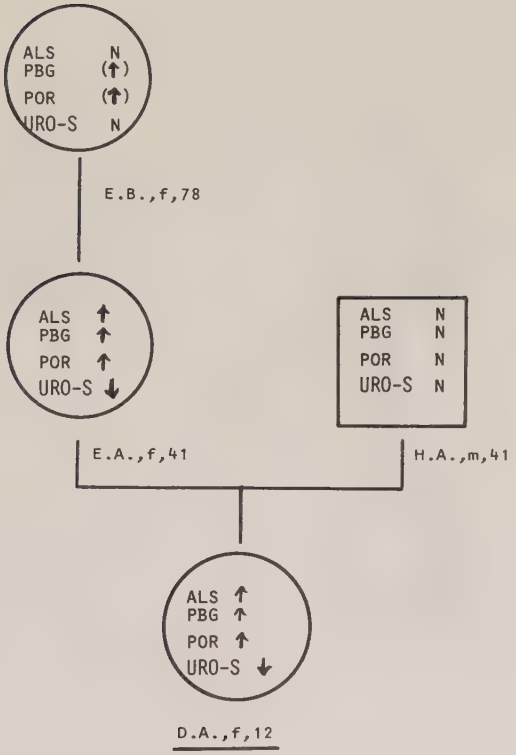


Abb. 17: Untersuchung der Familie der AIP-Patientin D.A.,f,12

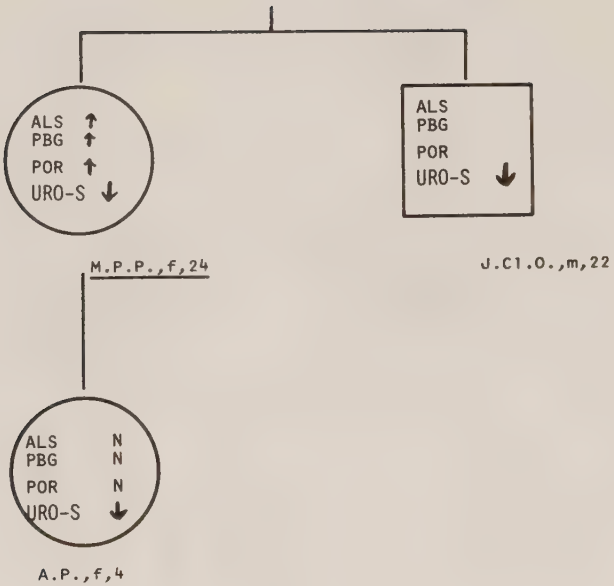


Abb. 18: Untersuchung der Familie der AIP-Patientin M.P.P.,f,24

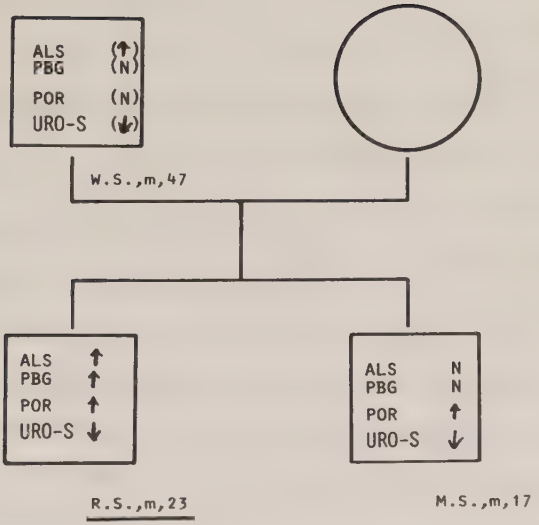


Abb. 19: Untersuchung der Familie des AIP-Patienten R.S.,m,23

mitglieder von dem genetisch bedingten Enzymdefekt betroffen sind. Zur Erstellung solcher Familienstudien sei an dieser Stelle vermerkt, daß sie nicht immer vollständig sind, da entweder einige Familienmitglieder bereits verstorben sind oder aus technischen oder psychologischen Gründen eine Untersuchung verweigern.

In Abb. 13 wurden die Eltern, Geschwister und die einzige Tochter einer Patientin (D.K.,f,22) untersucht. Anhand der URO-S-Bestimmung erkennt man die Anlage zur AIP bei der Mutter (A.M.,f,55), den Geschwistern (F.M.,m,25), (J.D.,f,23), (E.A.M.,m,20) und der Tochter (N.K.,f,4). Bemerkenswert ist die Beobachtung des URO-S-Defektes bei einer Halbschwester (M.P.P.,f,27) der Patienten, die der ersten Ehe der Mutter entstammt. Damit steht eindeutig die allen gemeinsame Mutter als Vererberin des Enzymdefektes fest. In der Abb. 14 hat die Patientin (W.V.,f,63) den URO-S-Defekt auf ihre Töchter und Enkelkinder vererbt. Der Patient (P.L.,m,26) in Abb. 15 hat die AIP-Anlage von seiner Mutter, seine Schwester hingegen nicht. Die Familienstudie in Abb. 16 zeigt eine nicht ganz eindeutige Enzymverteilung. Die Patientin (E.L.,f,67), die ein eindeutiges AIP-Muster im Urin und Stuhl aufweist, hat ebenso wie ihre

Schwester eine normal aktive URO-S. Ihre Töchter dagegen zeigen unterschiedliche Enzymaktivitäten. So finden wir bei (S.P.,f,34) eine leicht erniedrigte und bei (L.L.,f,40) eine deutlich erniedrigte Aktivität. Die nächste Generation läßt zum Teil exaktere Aussagen zu. So ist die URO-S bei jeweils einem Enkelkind (N.P.,m,11) und (A.L.,f,14) deutlich erniedrigt und bei den anderen leicht erniedrigt. In der Familie der Abb. 17 wurde bei der Patientin (D.A.,f,12) und bei der Mutter (E.A.,f,41) ein URO-S-Defekt festgestellt. Der Vater und die Großmutter mütterlicherseits tragen diesen Defekt nicht. Da der Großvater nicht mehr lebt, kann man nur bei ihm den Ursprung der Enzymstörung vermuten. Die Patientin (M.P.P.,f,24) in Abb. 18 ist ebenso wie ihr Bruder und ihre Tochter Trägerin des URO-S-Defektes. In Abb. 19 ist der Enzymdefekt des Patienten (R.S.,m,23) wie bei seinem Bruder sehr deutlich, beim Vater nicht so deutlich ausgeprägt.

Die Angaben dieser Genealogien zeigen in einigen Fällen nur undeutlich signifikante Enzymstörungen. Hier wurde die URO-S-Aktivität in der oben angedeuteten "Grauzone" gefunden. Etwas weiteres kann aus diesen Genealogien gesehen werden: Viele Familienangehörige von AIP-Patienten sind Träger eines ausgeprägten Enzym-

defektes. Sie entwickeln aber keine klinischen Symptome und nur einige von ihnen zeigen ein pathologisches Porphyrinmuster im Urin. Hierauf wird im Folgenden noch eingegangen. In diesem Zusammenhang muß auf eine weitere Beobachtung hingewiesen werden: Kinder im vorpubertären Alter haben bei AIP-Veranlagung durchaus eine verminderte URO-S-Aktivität, ihre Porphyrin- und Vorläuferausscheidung im Urin ist im Gegensatz zu Erwachsenen jedoch fast immer normal (64, 86, 108, 136).

Eine rein statistische Auswertung der vorliegenden Genealogien zeigt einen mehr oder weniger stark ausgeprägten URO-S-Defekt bei 27 Personen, während bei 8 Familienmitgliedern der Defekt nicht gefunden wurde. Das Vorkommen des Defektes überwiegt bei den weiblichen Familienangehörigen (60 % aller Fälle).

Im weiteren Verlauf unserer Studien zur URO-S wurde die Enzymaktivität bei den verschiedenen Porphyrieerkrankungen bestimmt. Die Aktivität liegt bei PV, CHP/PCT im oberen Normbereich und ist in Einzelfällen sogar gering erhöht und bei EPP und Pb-I liegt sie im unteren Normbereich und ist in Einzelfällen sogar leicht erniedrigt (Tab. 8.) (Abb. 20).

Tab. 8 Aktivität der Uroporphyrinogen-I-Synthase (µmol/l·h) in Erythrozyten bei Porphyria variegata (PV), erythropoetischer Protoporphyrie (EPP), chronischer hepatischer Porphyrie (CHP) einschließlich Porphyria cutanea tarda (PCT) und akuter Bleiintoxikation (Pb-I)

	A	B
PV	68,5 ± 7,8 ($\bar{x}$ ± s, n = 5) Bereich 57-78	73,8 ± 10,2 ($\bar{x}$ ± s, n = 5) Bereich 59-87
EPP	51,9 ± 8,5 ($\bar{x}$ ± s, n = 4) Bereich 42-62	58,0 ± 11,5 ($\bar{x}$ ± s, n = 4) Bereich 47-74
CHP/PCT	67,2 ± 7,4 ($\bar{x}$ ± s, n = 12) Bereich 56-80	71,4 ± 5,8 ($\bar{x}$ ± s, n = 6) Bereich 64-80
Pb-I	55,0 ± 6,6 ($\bar{x}$ ± s, n = 3) Bereich 49-62	57,3 ± 5,1 ($\bar{x}$ ± s, n = 3) Bereich 53-63
Kontrollen	61,0 ± 11,6 ($\bar{x}$ ± s, n = 302)	64,7 ± 12,7 ($\bar{x}$ ± s, n = 274)

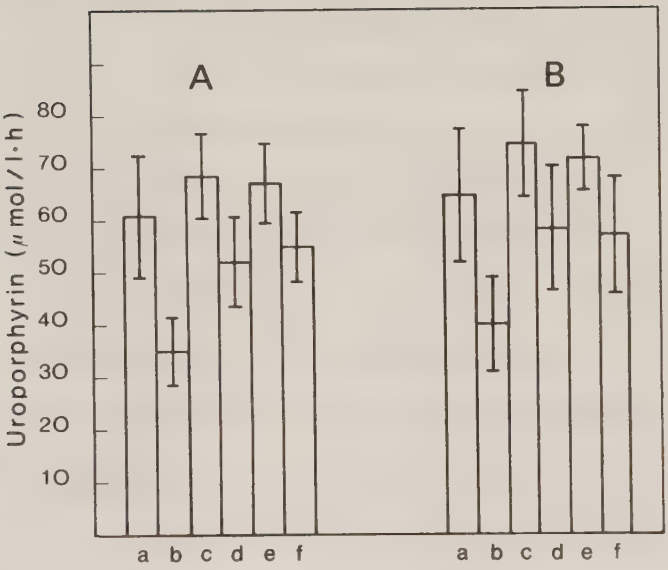


Abb. 20: Aktivität der URO-S in Erythrozyten von Patienten mit AIP, PV, EPP, CHP/PCT, Bleiintoxikation und Kontrollen

a: Kontrollen
b: AIP
c: PV
d: EPP
e: CHP/PCT
f: Pb-I

Ober die Enzymaktivität bei der HKP kann zur Zeit wegen der geringen Anzahl an Fällen und wegen der widersprüchlichen Ergebnisse keine präzise Aussage gemacht werden. Es wurden Aktivitäten sowohl im Normalbereich, wie auch stark über den Normbereich erhöht (ca. 140 % der Kontrollaktivität) gefunden.

Die Diagnose der klinisch manifesten akuten intermittierenden Porphyrie, einer autosomal dominanten Stoffwechselkrankheit mit vielfältigen klinischen Symptomen, wird primär anhand der charakteristischen Konstellation der Porphyrinvorläufer und Porphyrine im Urin gestellt (39, 46, 52, 53). Die Abgrenzung gegenüber den chronischen hepatischen Porphyrien ist hierbei kein Problem (37, 47, 50, 53, 54, 61, 102), die Abgrenzung zu den anderen akuten hepatischen Porphyrien hingegen gestaltet sich schwierig (66). Die Differenzierung der hereditären akuten hepatischen Porphyrien allein aus der Pathobiochemie des Metabolitstoffwechsels im Urin ist deshalb nicht einfach, da bei AIP, PV und HKP eine erhöhte Porphyrinvorläufer- und Porphyrinausscheidung gerade in der akuten Phase vorkommen kann. Hier

muß die Bestimmung der URO-S in Erythrozyten und eine Analyse der Faeces-Porphyrine weitere Aufschlüsse geben.

Die Tabellen 9.10.11. zeigen je ein Beispiel der Urin- und Faecesanalysen dieser Erkrankungen in der akuten Phase. Allen dreien gemeinsam ist die stark erhöhte Ausscheidung der Porphyrinvorläufer ALS und PBG. Die AIP zeigt ähnlich wie die PV in der Urin-Porphyrinausscheidung eine Dominanz von URO, gefolgt von KOPRO und PENTA; die Differenz zwischen URO und KOPRO in der AIP ist jedoch bedeutend größer als in der PV. Bei der HKP dominiert die Ausscheidung von KOPRO weitab gefolgt von PENTA und URO. Die Faecesanalysen lassen eine Differenzierung der Erkrankungen möglich erscheinen: In der AIP sind alle Porphyrine fast gleichmäßig erhöht. Die PV unterscheidet sich hier von der AIP durch wesentlich höhere Gesamtporphyrinausscheidung mit Dominanz von PROTO gefolgt von KOPRO. Die Stuhlporphyrine im hier aufgeführten akuten HKP-Fall sind noch stärker erhöht als in der PV. Hier ist die Hauptkomponente KOPRO, die von PROTO gefolgt wird.

Ein wesentliches Kriterium zur Erkennung von Genträgern und zur Differenzierung der hereditären

akuten hepatischen Porphyrien ist die enzymatische Bestimmung der URO-S-Aktivität in Erythrozyten (63, 64).

Tab. 9 Akute intermittierende Porphyrie (R.S.,m,23)
Porphyrine in Urin und Stuhl

	Urin (Normalwerte) nmol/24 h	Stuhl (Normalwerte) nmol/g
U	6.588 (4 - 29)	17 (1 - 7)
7	231 (0 - 4)	8 (0 - 3)
6	153 (0 - 3)	3 (0 - 1)
5	419 (0 - 6)	7 (0 - 4)
K	1.513 (21 - 119)	46 (5 - 37)
3	21 (0 - 2)	20 (0 - 16)
P	4 (0 - 2)	208 (21 - 151)
ALS	323.282 (1.900 - 48.860)	
PBG	205.593 (440 - 7.520)	

URO-S : 68 % Kontr.

Tab. 10 Porphyria variegata (W.H.,f,32)
Porphyrine in Urin und Stuhl

	Urin (Normalwerte) nmol/24 h	Stuhl (Normalwerte) nmol/g
U	3.030 (4 - 29)	89 (1 - 7)
7	188 (0 - 4)	55 (0 - 3)
6	114 (0 - 3)	50 (0 - 1)
5	496 (0 - 6)	54 (0 - 4)
K	2.050 (21 - 119)	620 (5 - 37)
3	56 (0 - 2)	164 (0 - 16)
P	18 (0 - 2)	874 (21 - 151)
ALS	282.137 (1.900 - 48.860)	
PBG	261.664 (440 - 7.520)	

URO-S : 110 % Kontr.

Tab. 11 Akute Hereditäre Koproporphyrie (M.T.,f,49)
Porphyrine in Urin und Stuhl

	Urin (Normalwerte) nmol/24 h	Stuhl (Normalwerte) nmol/g
U	761 (4 - 29)	93 (1 - 7)
7	252 (0 - 4)	155 (0 - 3)
6	197 (0 - 3)	93 (0 - 1)
5	900 (0 - 6)	268 (0 - 4)
K	9.386 (21 - 119)	1.885 (5 - 37)
3	261 (0 - 2)	439 (0 - 16)
P	233 (0 - 2)	1.815 (21 - 151)
ALS	228.634 (1.900 - 48.860)	
PBG	306.907 (440 - 7.520)	

URO-S : 140 % Kontr.

II. Uroporphyrinogen-Decarboxylase

Bereits in den früheren Arbeiten des Marburger Arbeitskreises über die PCT (38, 40) wurde auf Grund der Metabolitstudien in Leber und im Urin postuliert, daß der chronischen hepatischen Porphyrie ein URO-D-Defekt zugrunde liegen muß, der jedoch erst im Verlaufe des Lebens manifest wird, wenn zusätzliche, vor allem exogene Faktoren hinzukommen: z.B. Leberschaden, Alkohol und Östrogene. Studien an Leberhomogenaten von Patienten mit CHP ergaben dann eindeutig einen Decarboxylase-Defekt in der Leber (58). Damals haben wir auch in den Erythrozyten von einigen PCT-Patienten mit einer anderen Methode (siehe B. II. 2.) (47, 62, 163) einen URO-D-Defekt gefunden. Diese Beobachtung deckte sich weitgehend mit derjenigen, die KUSHNER (117, 118, 119) machte. Der Befund eines URO-D-Defektes in Erythrozyten blieb nicht unwidersprochen, da insbesondere die Arbeitsgruppe von PIMSTONE (8, 9) einen derartigen Defekt nicht finden konnte.

Die URO-D im Erythrozytenhämolysat wurde mit der hier (B. I. 4. 2.) beschriebenen Methode in 191 Fällen bestimmt. Im Untersuchungsgut befanden sich

71 Blutproben von Patienten oder deren Familienangehörigen mit CHP einschließlich PCT und 120 Kontrollen. Die Diagnose CHP bzw. PCT war aufgrund der klinischen Symptome und der Porphyrinanalysen im Urin gestellt worden.

Die URO-D-Aktivität der Kontrollerythrozyten lag bei 19,6 ± 3,1 µmol/l·h KOPRO ($\bar{x}$ ± s). Die URO-D-Aktivität der Erythrozyten von CHP/PCT-Patienten lag zum größten Teil (n = 59) mit 11,2 ± 3,3 ($\bar{x}$ ± s) signifikant ($p < 0{,}001$) unter derjenigen der Kontrollen. Im Mittel entspricht das 57 % der normalen Aktivität. Es wurde jedoch auch eine nicht zu vernachlässigende Zahl (n = 12) von CHP/PCT-Erythrozyten mit einer URO-D-Aktivität von 20,0 ± 1,8 ($\bar{x}$ ± s), also im Normalbereich liegend, gefunden (Tab. 12.).

Das Kollektiv der 59 Patienten mit erniedrigter URO-D-Aktivität bestand aus folgenden Patienten mit "sporadisch" vorkommender CHP/PCT: 19 mit klinisch und biochemisch gesicherter PCT, 1 mit CHP Typ C in Obergang zur PCT, 2 mit CHP Typ C, 3 mit CHP Typ B, 1 mit CHP Typ A in Obergang zu CHP Typ B, 4 mit CHP Typ A und 2 mit sekundärer Koproporphyrinurie, zum Teil in CHP Typ A übergenend. Von 3 Familienangehörigen konnte wegen fehlender Urinprobe keine Diagnose gestellt werden (Tab.13.14.15.16.17.)

Tab. 12 Vergleich der Aktivität der URO-D in Erythrozyten von Patienten mit CHP/PCT, AIP und Kontrollen

		URO-D-Aktivität	KOPRO µmol/l·h
CHP/PCT-Familien	(n = 27)	11,9 ± 3,5	($\bar{x}$ ± s)
CHP/PCT-Patienten sporadisch	(n = 32)	10,7 ± 3,1	($\bar{x}$ ± s)
Summe CHP/PCT	(n = 59)	11,2 ± 3,3	($\bar{x}$ ± s)
Kontrollen	(n = 120)	19,6 ± 3,1	($\bar{x}$ ± s)
$\bar{x}_{CHP/PCT} : \bar{x}_{Kontrollen}$	= 57%		
Signifikanz:	p < 0,001		
CHP/PCT-Patienten sporadisch mit normaler URO-D-Aktivität	(n = 12)	20,0 ± 1,8	($\bar{x}$ ± s)
AIP-Patienten	(n = 9)	11,8 ± 3,6	($\bar{x}$ ± s)

Tab. 13. URO-Decarboxylase in Erythrozyten bei sporadischen Patienten mit PCT.

Patient	Urin-Porphyrine						URO-D Aktivität	(% Kontr.)
	Gesamt	U	7	6	5	K	µmol/l·h KOPRO	
	nmol/24 h	% Verteilung						
G.K.,m,50	6.728	69	17	3	5	6	9,8	(50)
H.H.,m,33	3.780	52	30	4	5	9	9,8	(50)
H.K.,m,49	9.411	56	31	4	5	4	15,7	(80)
G.N.,m,35	13.965	72	23	2	1	2	8,4	(43)
K.E.,m,57	6.635	67	25	3	2	3	14,9	(76)
A.T.,m,62	3.705	44	31	6	5	14	13,7	(70)
H.B.,f,40	12.966	71	20	3	4	2	7,3	(37)
D.M.N.,f,11	7.439	66	26	3	2	3	13,1	(67)
H.W.,f,34	14.787	72	20	3	3	2	9,2	(47)
W.S.,m,73	6.941	43	23	12	8	14	15,1	(77)

E.W.,m,56	9.835	48	34	8	4	6	3,3	(17)
H.H.,m,40	6.364	54	34	3	2	7	14,5	(74)
U.K.L.,f,23	2.999	63	25	2	3	7	13,3	(68)
J.L.,m,44	2.414	74	15	2	4	5	12,3	(63)
N.S.,m,43	2.112	54	15	3	5	23	9,2	(47)
K.S.,m,47	2.807	45	35	5	7	8	9,2	(47)
J.W.,m,67	7.071	55	27	6	5	7	15,1	(77)
R.A.,m,53	4.388	43	30	8	9	10	10,6	(54)
$\bar{x}$ (n = 19)	6.908	58	26	4	4	7	11,4	(58)

Kontrollen: n = 120
URO-D = 19,6 $\pm$ 3,1 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 14. URO-Decarboxylase in Erythrozyten bei sporadischen Patienten mit sekundärer Koproporphyrinurie und CHP

Patient	Diagnose anhand der Urin-Porphyrine		Urin-Porphyrine Gesamt	U	7	6	5	K	URO-D Aktivität µmol/l·h
			nmol/24 h	% Verteilung					(% Kontr.)
H.M.,m,55	CHP C	PCT	1.832	50	23	6	5	16	7,3 (37)
R.F.,f,5	CHP C		824	57	32	3	3	5	8,0 (41)
J.S.,f,37	CHP C		1.559	44	26	5	5	20	11,8 (60)
N.U.,m,46	CHP B		1.369	56	21	2	3	18	7,1 (36)
W.S.,m,37	CHP B		531	49	15	4	3	29	4,7 (24)
L.R.,f,46	CHP B		743	52	20	3	5	20	8,4 (43)
K.M.,m,57	CHP A	B	533	28	23	2	3	44	12,7 (65)
H.H.,m,62	CHP A		194	16	8	2	4	70	10,2 (52)
K.H.,m,48	CHP A		260	26	10	3	4	57	13,1 (67)
E.H.,m,51	CHP A		415	18	7	2	5	68	7,3 (37)
H.S.,m,45	CHP A		359	15	9	2	1	73	10,0 (51)
D.F.,f,31	sK		311	8	1	1	2	88	13,1 (67)
J.A.,m,24	sK		240	13	4	3	6	74	13,7 (70)
									9,8 ± 2,9 (50)
									($\bar{x}$ ± s)

Kontrollen : n = 120

URO-D : 19,6 ± 3,1 ($\bar{x}$ ± s)

Tab. 15 Uroporphyrionogen-Decarboxylase Defekt in Erythrozyten von Familien mit chronisch hepatischer Porphyrie CHP/Porphyria cutanea tarda PCT

Familie	Patient	Diagnose anhand der Urin Porphyrine	Urin Porphyrine Gesamt nmol/24 h	U	7	6	5	K (% Verteilung)	URO-D-Aktivität in Erythrozyten KOPRO µmol/l·h	(% Kontr.)
I	M.R.,m,64	PCT	2.254	54	29	6	4	7	16,3	(83)
	A.R.,m,37	PCT	2.855	56	28	5	4	7	15,9	(81)
II	Vm.R.,m,63	CHP C	1.371	55	21	4	5	15	10,4	(53)
	Vb.R.,m,60	PCT	7.048	59	28	4	5	4	10,4	(53)
III	R.M.,m,47	CHP B	545	30	10	3	8	49	8,4	(43)
	A.M.,m,34	CHP A	432	43	13	5	3	36	9,6	(49)
IV	F.L.,m	PCT	8.301	52	31	5	4	8	8,2	(42)
	L.L.,m	sK	249	13	11	2	4	70	12,0	(61)

Kontrollen : n = 120

URO-D : KOPRO µmol/l·h 19,6 ± 3,1 ($\bar{x} \pm s$)

Signifikanz : $p < 0{,}001$

Tab. 16 Uroporphyrinogen-Decarboxylase Defekt in Erythrozyten von Familien mit chronisch hepatischer Porphyrie CHP/Porphyria cutanea tarda PCT in Analogie zu den Genealogien

Familie (Abb.Nr.)	Patient	Diagnose anhand der Urin Porphyrine	Urin-Porphyrine Gesamt nmol/24 h	U	7	6	5	K	URO-D-Aktivität in Erythrozyten KOPRO µmol/l·h	(% Kontr.)
				% Verteilung						
	K.S.,m,56	CHP A	343	23	5	1	2	69	3,3	(17)
22	J.S.,m,32	sK	195	12	3	2	4	79	4,5	(23)
	H.H.,f,31	PCT	1.712	66	16	2	4	12	3,9	(20)
	H.Th.,m,66	sK CHP A	244	8	4	1	2	85	16,7	(85)
23	H.P.Th.,m,28	sK	157	8	4	1	2	85	12,3	(63)
	H.Th.,f,20	sK CHP A	108	17	8	1	3	71	11,0	(56)
	K.E.D.,m,63	PCT	5.870	63	26	3	3	5	12,0	(61)
	P.D.,m,35	CHP A	370	11	4	1	3	81	15,9	(81)
24	B.O.,f,33	CHP A	236	17	6	1	1	75	12,3	(63)
	A.D.,m,64	CHP B	742	46	14	1	5	34	10,8	(55)
	K.H.H.,m,54	sK	281	4	2	1	1	92	12,7	(65)
	P.E.H.,m,30								15,1	(77)
25	G.H.,f,20								14,7	(75)
	A.H.,f,11								12,7	(65)

Tab. 17 Bestimmung der Uroporphyrinogen Decarboxylase Aktivität in Erythrozyten (Abb. 26) von vier Generationen der Familie des PCT-Patienten L.A.,m,54.

	Diagnose	Urin Gesamtporphyrine nmol/24 h	% Verteilung U	7	6	5	K	URO-D µmol/l·h KOPRO	% Kontr.
K.A.,m,84 (Vater)								12,5	64
L.A.,m,54 (Patient)	PCT	5.291	53	29	5	4	9	14,9	76
C.H.,f,30 (Tochter)	sK CHP A	275	10	2	1	2	85	12,7	65
J.H.,m,9 (Enkel)	sK	139	8	2	1	2	87	10,0	51
E.H.,m,8 (Enkel)	sK CHP A	270	9	2	1	2	86	12,0	61
R.A.,f,19 (Tochter)	sK CHP A	215	11	1	1	2	85	14,1	72

Kontrollen : n = 120

URO-D : KOPRO µmol/l·h 19,6 $\pm$ 3,1 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 18 Sporadische CHP/PCT-Fälle mit normaler URO-D-Aktivität in den Erythrozyten

Patient	Diagnose anhand der Urin Porphyrine	Urin-Porphyrine Gesamt	U	7	6	5	K	URO-D-Aktivität µmol/l·h	
		nmol/24 h	% Verteilung						(% Kontr.)
H.V.,m,65	CHP A	547	36	17	1	4	39	17,2	(88)
G.H.,f,27	PCT	3.577	67	35	3	2	3	19,4	(99)
J.N.,m,71	PCT	1.984	66	22	3	3	6	23,7	(121)
A.P.,m,73	PCT	5.390	85	5	1	2	7	20,8	(106)
J.K.,m,41	PCT	2.153	59	23	3	4	11	20,0	(102)
H.S.,m,62	CHP A	592	22	13	3	7	55	20,4	(104)
B.B.,m,24	CHP A	525	26	13	3	6	52	21,6	(110)
J.D.,m,69	PCT	4.716	58	20	3	6	13	19,8	(101)
H.W.,m,50	PCT	3.922	63	26	4	3	4	21,0	(107)
H.W.,m,53	PCT	5.503	45	38	6	4	7	17,2	(88)
D.M.,m,47	CHP B	1.186	6	4	1	1	88	19,0	(97)
A.K.,m,44	CHP B	616	37	20	4	7	32	20,0	(102)
Kontrollen : n = 120								20,0 ± 1,8	
URO-D : KOPRO µmol/l·h		19,6 ± 3,1 ($\bar{x}$ ± s)						($\bar{x}$ ± s)	

Die 12 CHP/PCT-Fälle mit normaler URO-D-Aktivität teilen sich wie folgt auf: 7 PCT, 2 CHP Typ B und 3 CHP Typ A (Tab.18.).

Die Abbildung der einzelnen Bestimmungsergebnisse (Abb. 21) zeigt ähnlich wie bei der URO-S eine deutliche Oberlappungszone. Auch hier schränkt die "Grauzone" die Eignung dieser Enzymbestimmung als alleiniges diagnostisches Kriterium ein. Es kann aus obigen Resultaten jedoch geschlossen werden, daß bei einer Verminderung der Enzymaktivität in den Erythrozyten um mehr als 30 % ein Enzymdefekt vorliegen muß. Eine Porphyrinbestimmung in Urin, Serum, Leber oder Faeces bleibt zur Diagnosefindung unerläßlich.

Die CHP/PCT wird seit längerer Zeit als hereditäre Stoffwechselstörung beschrieben (28, 142, 178, 197, 199, 203, 206). Die Mehrzahl der Autoren wertet als Kriterium für die Heredität das Auftreten der klinischen Symptome bei PCT oder die für CHP spezifische Porphyrinausscheidung im Urin bei Familienuntersuchungen. Die eigentliche Ursache der Stoffwechselstörung, eine verminderte Aktivität der URO-D, wies KUSHNER et al. (118) in drei Familien nach.

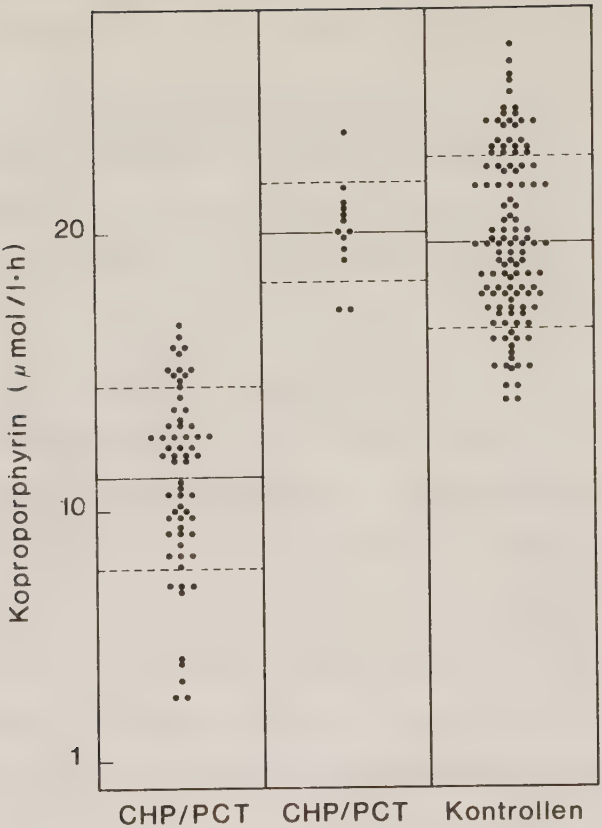


Abb. 21: Verteilung der Aktivität der URO-D in Erythrozyten bei Patienten mit CHP/PCT und Kontrollen

Die folgenden Genealogien (Abb. 22 - 26) in Verbindung mit Tab.16.17. sollen anhand der hier beschriebenen Methode die Vererbung des URO-D-Defektes aufzeigen.

In Abb. 22 zeigt die Patientin (H.H.,f,31) eine klinisch und biochemisch gesicherte PCT mit deutlich verminderter URO-D-Aktivität. Dieser Enzymdefekt tritt sowohl bei ihrem Bruder wie bei ihrem Vater auf. Während der Vater eine CHP Typ A entwickelt hat, ist beim Bruder lediglich eine sekundäre Koproporphyrinurie festzustellen. Die Familie in Abb. 23 hat bislang keine manifeste PCT entwickelt. Bei allen untersuchten Familienmitgliedern wird eine sekundäre Koproporphyrinurie diagnostiziert, lediglich beim Vater (H.T.,m,66) ist ein Obergang in eine CHP Typ A zu erkennen. Die URO-D ist beim Vater leicht, bei den Kindern deutlich im Vergleich zu Kontrollen erniedrigt. In der Familie in Abb. 24 hat der Vater (K.E.D.,m,63) eine deutliche PCT mit verminderter URO-D. Bei seinen Kindern wird eine CHP Typ A mit mehr oder weniger ausgeprägtem Enzymdefekt diagnostiziert. Der Bruder (A.D.,m,64) des PCT-Patienten ist ebenfalls Träger des URO-D-Defektes und zeigt in seiner Urin-Porphyrinausscheidung das

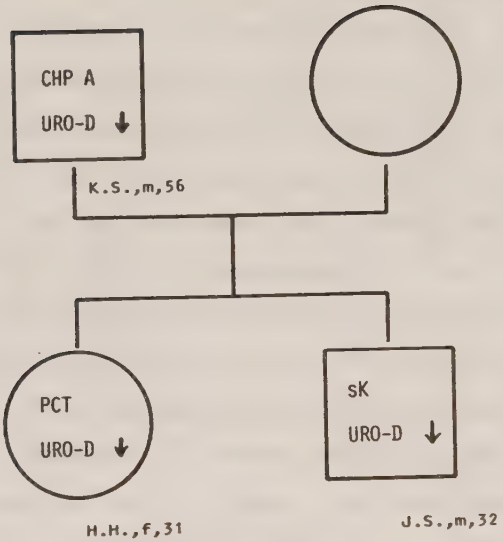


Abb. 22: Untersuchung zur URO-D in der Familie der PCT-Patientin H.H.,f,31

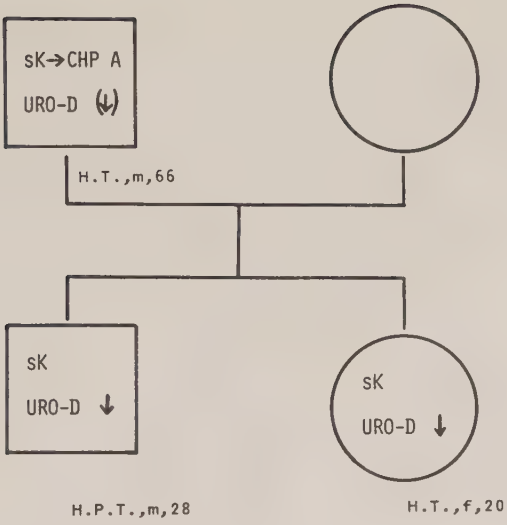


Abb. 23: Untersuchung zur URO-D in der Familie des CHP-Patienten H.T.,m,66

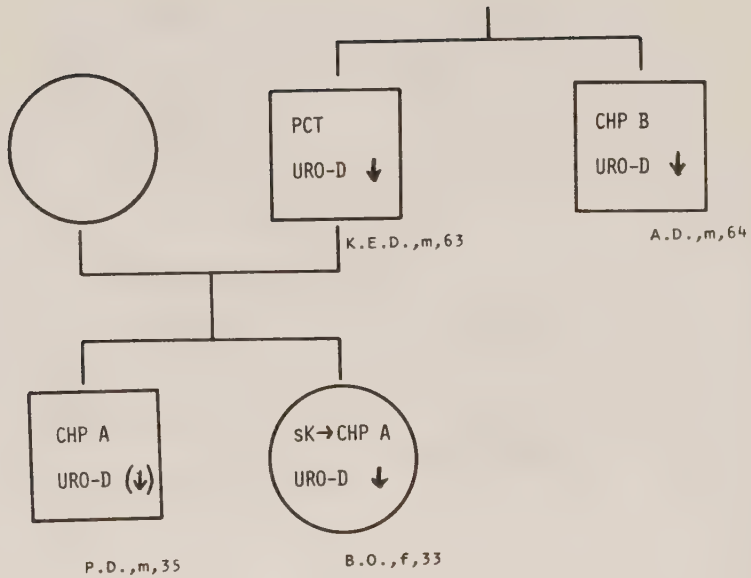


Abb. 24: Untersuchung zur URO-D in der Familie des PCT-Patienten K.E.D.,m,63

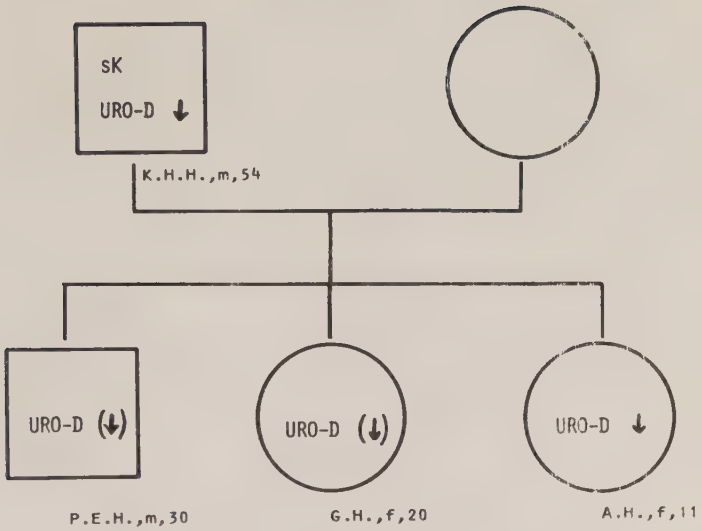


Abb. 25: Untersuchung zur URO-D in der Familie des Patienten K.H.H.,m,54

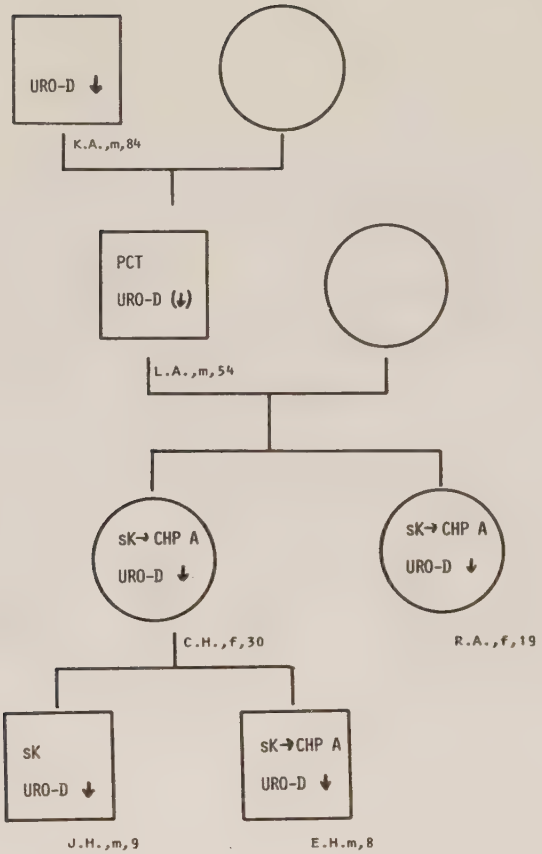


Abb. 26: Untersuchung zur URO-D in der Familie des PCT-Patienten L.A.,m,54

typische Muster einer CHP Typ B. Daraus geht hervor, daß die Veranlagung zu einer CHP in dieser Familie vom Vater vererbt wurde. Die Genealogie in Abb. 25 zeigt lediglich die Vererbung des Enzymdefektes, da nur vom Vater eine Urinanalyse durchgeführt werden konnte. Hier ist beim Vater (K.H.H.,m,54) eine sekundäre Koproporphyrinurie bei deutlichem URO-D-Defekt zu sehen. Die Kinder (P.E.H., m,30) und (G.H.,f,20) liegen mit der Enzymaktivität im Bereich der "Grauzone", während beim jüngsten Kind (A.H.,f,11) die Aktivität erniedrigt ist. Beim Patienten (L.A.,m,54) in Abb. 26 ist klinisch und biochemisch seit langem eine PCT bekannt. Die Aktivität der URO-D ist nicht so deutlich erniedrigt wie bei seinen Töchtern und Enkeln, die alle eine sekundäre Koproporphyrinurie mit Obergang zur CHP Typ A haben. Beachtenswert ist hier die erhöhte Urin-Porphyrinausscheidung bei den Enkeln. Der Vater des Patienten (K.A.,m,84) hat ebenfalls den Enzymdefekt. Dieser wurde bis in die dritte Generation vererbt.

Die hier abgebildeten und beschriebenen Genealogien und weitere noch unvollständige Familienuntersuchungen (Tab. 15.) zeigen deutlich

einen nachweisbaren hereditären URO-D-Defekt. Dieser Enzymdefekt hat nicht immer eine CHP/PCT zur Folge, sondern kann latent in Form einer normalen Urin-Porphyrinausscheidung oder einer sekundären Koproporphyrinurie bleiben.

Die Auswertung der Familienuntersuchungen ergab bei insgesamt 20 Fällen mit verminderter URO-D-Aktivität ein Oberwiegen bei den männlichen Familienmitgliedern (65 %).

E. D I S K U S S I O N

I. Pathobiochemie der Uroporphyrinogen-I-Synthase

Die vorliegenden enzymatischen Studien zur URO-S in Erythrozyten haben sowohl bei Patienten mit klinisch und biochemisch gesicherter AIP als auch bei einem Großteil derer Blutsverwandter eine mehr oder weniger ausgeprägte Aktivitätsverminderung gezeigt. Diese Beobachtung steht in Obereinstimmung mit anderen Autoren (14, 18, 19, 41, 46, 63, 64, 86, 87, 94, 108, 114, 115, 116, 126, 133, 134, 136, 145, 157, 158, 160, 163, 187, 189), von denen einige diesen Enzymdefekt auch in der Leber (187) und in Fibroblasten (14) nachweisen konnten. Die URO-S als zytosolisches Enzym entfaltet ihre Aktivität also nicht nur in den Zellen des erythropoetischen Systems, sondern ist auch im Zytosol anderer Zellen aktiv. Die Folgen eines Enzymdefektes an dieser Stelle des Biosyntheseweges zum Häm sind vielgestaltig und sollen hier kurz umrissen werden.

Die URO-S katalysiert die Bildung von Uroporphyrinogen-I aus vier Molekülen PBG. Eine Aktivitätsminderung dieses Enzyms bewirkt eine geringere

Synthese von Porphyrinogenen und damit folglich auch von Häm. Dieses wirkt in Abhängigkeit seiner Konzentration in der Leberzelle durch Rückkopplungsmechanismen regulativ auf die ALS-S. Die Folge verringerter Hämsynthese ist eine Induktion der ALS-S und somit eine gesteigerte Biosynthese von ALS und PBG. Dieses so vermehrte Substratangebot wird in gewissem Umfang durch die URO-S in Porphyrinogene und Häm umgesetzt. Die Hämkonzentration ist wieder ausgeglichen (48).

Eine Belastung der Hämbilanz durch Metabolisierung von bestimmten Pharmaka (48, 68) oder Kumulation von 5β-Steroiden durch Aktivitätsverminderung der Δ^4-5_α-Steroid-Reduktase (108) führt zur verstärkten Induktion der ALS-S und damit zu wesentlich größerer Synthese von ALS und PBG. Die Aktivität der URO-S ist für dieses plötzliche übermäßige Substratangebot nicht mehr ausreichend. Es kommt zu einem partiellen Block und die relative enzymatische Konversion von PBG zu URO'gen verringert sich. Trotz dieses partiellen Blocks der URO-S wird die reale Konzentration an Porphyrinogenen gesteigert und führt über den Biosyntheseweg zu erhöhter Hämsynthese. Eine Er-

höhung der Hämkonzentration in der Leberzelle bewirkt auf dem Rückkopplungswege eine Stabilisierung der ALS-S. Die Induktion der ALS-S überspielt somit die Störung der Biosynthesekette an der Stelle der URO-S durch gesteigerte Bereitstellung des Substrates PBG und folglich erhöhter Porphyrinogensynthese.

Sämtliche Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Porphyrinogene und Vorläufer entlang des Biosynthesewegs zum Häm werden sichtbar in der Ausscheidung im Urin. So zeigt die Urinanalyse eines Patienten mit einer manifesten AIP hohe Konzentrationen an ALS und PBG sowie an Porphyrinen.

In einem Modellversuch mit oraler ALS-Belastung (56, 134) eines gesunden Probanden sowie eines Patienten mit latenter AIP konnte die Induktion der ALS-S nachvollzogen werden. Anhand der Urinmetabolitstudien wurde gezeigt, daß die URO-S auch physiologischerweise ein kritischer Schritt der Hämsynthese ist, da dieses Enzym nur begrenzte Mengen an PBG umsetzen kann. Auch hier erwies sich, daß sowohl beim gesunden Probanden wie beim AIP-Patienten PBG nicht in

adäquaten Mengen in URO'gen utilisiert wurde.

Eine weitere Möglichkeit, den Engpaß der Porphyrinbiosynthese an der Stelle der URO-S zu erklären, kann die Bestimmung des K_M-Wertes der URO-S geben (122). Mit der hier beschriebenen Methode wurde der K_M-Wert der URO-S in erhitzten Erythrozyten von AIP-Patienten und Kontrollpersonen ermittelt (Abb. 27). Dabei ergab sich für die URO-S in Erythrozyten von AIP-Patienten (n=4) ein K_M-Wert von $10{,}5 \cdot 10^{-6}$ mol PBG ($\bar{x}$) und für Kontrollen (n=4) von $22 \cdot 10^{-6}$ mol PBG ($\bar{x}$). Das bedeutet, die Affinität des Substrats zur URO-S in AIP-Erythrozyten ist größer als zu Kontrollen und die halbe V_{max} der Umsetzung von PBG zu URO'gen wird in AIP-Erythrozyten im Vergleich zu Kontrollen mit annähernd der halben Menge an Substrat erreicht.

Normalerweise ist die Konzentration an PBG in der Leber geringer als die K_M der URO-S (187). Die Porphyrinbiosynthese verläuft dann ohne Störungen. Schon bei geringer Induktion der ALS-S nähert sich die Konzentration an hepatischem PBG dem Wert der K_M der URO-S. Bei Patienten mit AIP wird dieser Bereich schneller erreicht. Nach obigem ALS-Belastungsmodell staut sich das Substrat vor der URO-S. PBG wird

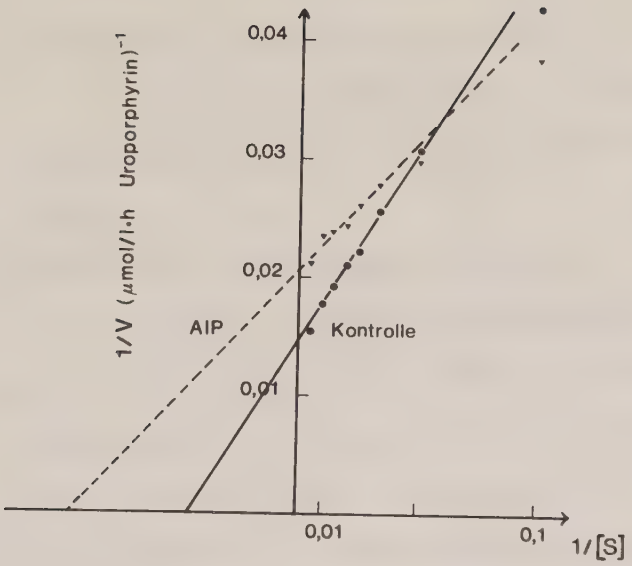


Abb. 27: Bestimmung des K_M-Wertes der URO-S in Erythrozyten von AIP-Patienten und Kontrollen

in geringerem Verhältnis zu Porphyrinogenen umgesetzt und die Induktion der ALS-S kann potenziert werden. Eine Entgleisung der Porphyrinbiosynthese ist die Folge.

Der Befund eines unterschiedlichen K_M-Wertes der URO-S in AIP-Erythrozyten im Vergleich zu Kontrollen ist widersprüchlich. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der URO-S in Erythrozyten mit verschiedenen Methoden. Einige Autoren haben ebenfalls den K_M-Wert bestimmt. In Obereinstimmung mit den hier dargelegten Ergebnissen fanden SASSA et al. (158) einen K_M-Wert, der in Erythrozyten von AIP-Patienten halb so groß ist im Vergleich zu Erythrozyten von Kontrollpersonen. Bei STRAND et al. (189), MAGNUSSEN et al. (126) und KREIMER-BIRNBAUM (115) wurde der K_M-Wert in gleicher Größenordnung sowohl in AIP-Erythrozyten als auch in Kontrollen gefunden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur familiären AIP haben deutlich gezeigt, daß der Defekt der URO-S über mehrere Generationen nachgewiesen werden kann. Korrelierende klinische Beobachtungen und klinisch biochemische Porphyrin- und Vorläuferbestimmungen lassen jedoch keinen einheitlichen Typ der AIP erkennen.

Bei Integration sämtlicher Befunde bei AIP-Patienten einschließlich der Familienstudien kann die AIP in vier Phasen eingeteilt werden (64):

A. die Phase des enzymatischen Defektes
B. die kompensierte Latenzphase
C. die dekompensierte Latenzphase
D. die Phase der akuten Manifestation.

Langzeitstudien an AIP-Patienten (67) haben gezeigt, daß unter Therapiemaßnahmen die einzelnen Phasen von der akuten Manifestation bis zur Latenzphase durchlaufen werden können. Die Aktivität der URO-S ändert sich dabei jedoch nur unwesentlich. Sie ist also unabhängig von der jeweiligen Phase der AIP. Das wird auch aus allen Einzeluntersuchungen (Tab. 19.) ersichtlich. Diese Beobachtung steht in Obereinstimmung mit BRODIE et al. (19).

Die Familienuntersuchungen verdeutlichen, daß bei Kindern im vorpubertären Alter, wenn sie Träger eines URO-S-Defektes sind, die Diagnose AIP gestellt werden kann. Ihre Porphyrin- und Vorläuferausscheidung im Urin ist jedoch normal. Eine Mög-

Tab. 19 Aktivitätsbestimmung der Uroporphyrinogen-I-Synthase in den Erythrozyten
Ergebnisse verschiedener Autoren mit unterschiedlichen Bestimmungsmethoden

Erythrozyten-Material	Aktivität (V_{max}) ($\bar{x} \pm s$)	K_m (µM/PBG)	Methodentyp	Autor
	pmol Porphyrine/mg Protein/h			
Kontrollen	35,0 ± 5,2	6	Makro	STRAND et al.
A I P	16,0 ± 3,3	6		(1972) 189
Kontrollen	134,2 ± 25,8		Makro	MEYER (1973) 133
A I P	77,0 ± 11,6			
Kontrollen	151,4	13,9	Makro	MAGNUSSEN et al.
A I P	68,0	13,7		(1974) 126
Kontrollen	93,7 ± 17,9	6,3	Mikro	KREIMER-BIRNBAUM
A I P	38,5 ± 6,2	6,9		(1975) 115
Kontrollen	49,5 ± 6,4		Makro	MUSTAJOKI et al.
A I P	30,5 ± 9,7			(1976) 136
	pmol Porphyrine/mg Protein/30 min. (450°)			
Kontrollen	157,0 ± 22,0		Makro	GRANDCHAMP et al.
A I P	80,0 ± 17,0			(1976) 87
	µmol Porphyrine/l Ery/h			
Kontrollen	35,7 ± 8,4	12,3	Mikro	SASSA et al.
A I P	18,0 ± 5,0	6,2		(1974) 158
Kontrollen	40,7	13,9	Makro	MAGNUSSEN et al.
A I P	17,6	13,7		(1974) 126
Kontrollen	36,5 ± 7,7	6,3	Mikro	KREIMER-BIRNBAUM
A I P	15,0 ± 2,4	6,9		(1976) 115
Kontrollen	64,7 ± 12,7	22,0	Mikro	DOSS, v. TIEPERMANN
A I P	39,8 ± 9,0	10,5		(1977) 63,64

lichkeit zur Diagnose besteht demnach hier nur in der Bestimmung der URO-S-Aktivität in den Erythrozyten.

Die Enzymbestimmung sollte als Präventivmaßnahme bei Auftreten einer AIP unbedingt bei allen blutsverwandten Familienmitgliedern durchgeführt werden (63), unter Umständen kann bei Vorhandensein des URO-S-Defektes durch endogene oder exogene Induktion der ALS-S die Porphyrinbiosynthese auch bei Kindern gestört werden. Ein Übergang in die manifeste Form der AIP ist dann nicht auszuschließen. Einen solchen Fall konnten wir bei einem 12-jährigen Mädchen (D.A.,f,12) beobachten (112). Aus der Anamnese war eine Medikamentation mit Hydantoin ersichtlich. Dieses Pharmakon wird zu Barbiturat metabolisiert, einem Stoff, der auf Grund der Induktion der ALS-S als porphyrieauslösend bekannt ist.

In Abb. 12 sind die Einzelergebnisse der URO-S Aktivitätsbestimmung in AIP-Erythrozyten neben den Kontrollen punktuell aufgezeichnet. In der Abbildung fällt eine Überschneidung des oberen AIP-Bereiches mit dem unteren Kontrollbereich auf. Diese "Grauzone" beeinträchtigt die Aussagekraft der URO-S-Bestimmung

als alleiniges diagnostisches Kriterium. Die Diagnose einer AIP sollte deswegen auf drei Säulen ruhen: der Porphyrinbestimmung in Urin und Faeces, der Bestimmung von ALS und PBG im Urin und der Aktivitätsbestimmung der URO-S in den Erythrozyten. Bei Erniedrigung der URO-S Aktivität um 30 % gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen kann ein enzymatischer Defekt bei Genträgern der AIP angenommen werden.

II. Pathobiochemie der Uroporphyrinogen-Decarboxylase

Das zweite in dieser Arbeit näher untersuchte Enzym der Hämbiosynthesekette, die URO-D, ist ebenfalls im Zytosol lokalisiert. Wie schon anhand der Metabolitstudien in Leber (34, 37, 50, 53, 69) und Urin vermutet (37, 38, 50, 53, 54), liegt der CHP/PCT eine Verminderung der URO-D-Aktivität als biochemische Abnormalität zugrunde. Diese Aktivitätsverminderung konnte in Biosynthesestudien im Leberhomogenat von CHP/PCT-Patienten nachgewiesen werden (58). Dabei war der Enzymdefekt besonders auffällig in den Decarboxylierungsstufen von URO'gen I zu HEPTA'gen I und von HEPTA'gen III zu HEXA'gen III (58). Da die URO-D ein zytosolisches Enzym ist, wurden auch Aktivitätsstudien in Erythrozyten durchgeführt (62, 118, 163, 197). Diese zeigten ebenfalls den Enzymdefekt. Im Gegensatz zum Defekt der URO-S bei der AIP sind die Folgen einer verminderten URO-D-Aktivität anders gelagert.

Frühere Untersuchungen zur hepatischen ALS-S Aktivität ließen eine Induktion der ALS-S bei CHP/PCT vermuten (135, 177, 223). In Analogie zu den Betrachtungen zur URO-S würde diese Be-

obachtung einen Einfluß des URO-D-Defektes in den molekularen Regulationsmechanismus der Hämbiosynthese bedeuten und unter anderem eine Erhöhung der Urinausscheidung von ALS und PBG zur Folge haben. Obigen Befunden zur ALS-S-Aktivität bei CHP/PCT wurde jedoch von anderen Autoren widersprochen (110, 146, 187). Diese fanden teilweise nur bei PCT mit excessiver Porphyrinausscheidung eine geringe Erhöhung der ALS-S-Aktivität und im Zusammenhang damit nur geringe Erhöhungen der ALS-Ausscheidung im Urin bei normalen PBG-Werten.

In letzter Zeit wird die Auffassung vertreten (72), die Aktivität der URO-D sei in der Leber etwa zehnfach höher als die der URO-S. Damit wäre der geringe induzierende Effekt der verminderten URO-D-Aktivität auf die ALS-S zu erklären. Trotz der in dieser Arbeit beobachteten Aktivitätsverminderung um die Hälfte ist die "defekte" URO-D immer noch aktiv genug, um eine ausreichende Menge Porphyrinogene zur Hämsynthese zu decarboxylieren. Die nicht umgesetzten Porphyrinogene werden als Porphyrine im Urin ausgeschieden oder in der Leber akkumuliert.

Einige Kliniker berichten über Siderosen in Assoziation mit der PCT (102, 106). In diesem Zusammenhang unternahm die Arbeitsgruppe um KUSHNER (119) Studien zur URO-D im Lebergewebe unter Einfluß von Eisen-II und beobachtete eine deutliche Inhibition des Enzyms. Patienten mit PCT wurden daraufhin mit Aderlaßtherapie oder anderweitiger Eisenausschwemmung behandelt. Die Porphyrinausscheidung im Urin verminderte sich, die verminderte Aktivität der hepatischen URO-D blieb jedoch bestehen (75, 118). Daraus wird geschlossen, daß ein überhöhter Eisenspiegel oder eine Siderose den URO-D-Defekt nicht verursachen, seine Auswirkung jedoch potenzieren kann.

Eine weitere klinische Beobachtung mag zur Klärung der Genese der CHP/PCT beitragen: Bei Patienten mit CHP/PCT wurden Leberbiopsien histologisch untersucht. Dabei konnten in allen Fällen Leberschäden diagnostiziert werden (7, 102). Ähnliche Leberzellschäden wurden in Rattenexperimenten beobachtet (25, 124, 139, 179, 190, 191, 200, 207). Hier hatte man die Tiere chronisch mit HCB behandelt. Diese entwickelten im Laufe der Zeit biochemische Abnormalitäten, die einer CHP/PCT des Menschen gleichen.

Die beschriebene Leberzellschädigung durch Membranläsionen könnte einerseits auf eine direkte Einwirkung des HCB auf die Permeabilität der Liposomenmembran zurückzuführen sein (179), andererseits auch durch metabolische Zwischenstufen nach Biotransformation des HCB, die möglicherweise durch Cytochrom P-450 erfolgt (124). Dieses Enzym wurde in der Leber nach HCB-Intoxikation erhöht gefunden (186). Untersuchungen der URO-D-Aktivität im Leberhomogenat ergaben sowohl bei Patienten mit CHP/PCT (58) als auch bei HCB behandelten Ratten (161) signifikante Enzymdefekte gegenüber Kontrollen.

Eine weitere Parallelität in der Auswirkung der Leberzellschädigung bei der CHP/PCT und der experimentellen HCB-Porphyrie ist in der Akkumulation von Porphyrinen in der Leber zu sehen (123, 125, 182). Im Gegensatz zu AIP-Leberbiopsien, die unter UV-Licht keine Porphyrinfluoreszenz zeigen, fluoreszieren jene auf Grund ihres Porphyringehaltes. Diese Beobachtungen und Experimente zeigen eine deutliche Assoziation der CHP/PCT mit einer Leberzellschädigung.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur URO-D in Erythrozyten zeigen einen

signifikanten Enzymdefekt bei Patienten mit CHP/PCT. Dieser Defekt ist auf Grund der Familienstudien als genetisch bedingt (118, 197) anzusehen. Die Porphyrinbestimmung im Urin der einzelnen Familienmitglieder zeigt bei verminderter URO-D-Aktivität unterschiedliche Ausscheidungsmuster, die das diagnostische Spektrum von der sekundären Koproporphyrinurie bis zur PCT umfassen. Sogar bei Kindern (von PCT-Familien) im vorpubertären Alter werden die Porphyrine im Urin in erhöhtem Maße ausgeschieden.

Durch einen genetischen Enzymdefekt, der als pathobiochemische Ursache der PCT anzusehen ist, kann sich im Laufe der Zeit aus einer geringgradigen Porphyrinbiosynthesestörung eine biochemisch manifeste CHP und daraus eine klinische PCT entwickeln, wenn diese Störung potenziert wird. Ein Faktor, der in den letzten Jahren die Lebensgewohnheiten vieler Menschen in zunehmendem Umfang beeinflußt, der Alkoholkonsum, bewirkt eine solche Potenzierung (47). Der Alkoholabusus hat nicht nur Leberzellschädigungen zur Folge, sondern er hat auch Einfluß auf die Porphyrinbiosynthese. Unter Alkoholeinfluß wird die ALS-S (174) induziert und die ALS-D (113) zum Teil inhibiert. Eine

Stimulation der Porphyrinsynthese ist die Konsequenz. Neben dem Alkohol fördern Östrogene (33, 43, 47) und Arzneimittelabusus (47) die Entwicklung einer PCT.

Bei Auftreten einer manifesten PCT bietet sich die Aktivitätsbestimmung der URO-D bei allen Familienangehörigen als prophylaktische Maßnahme zur Erkennung des Enzymdefektes an. Träger dieses Defektes sind potentielle CHP/PCT-Patienten. Sie müssen ihre Lebensgewohnheiten so einrichten, daß sie den Enzymdefekt nicht potenzieren und infolgedessen eine PCT entwickeln.

Der Befund einer normalen URO-D-Aktivität in den Erythrozyten von Patienten mit CHP/PCT scheint den bisherigen Ausführungen zu widersprechen. Eine Erklärung dieser Beobachtung kann zur Zeit nur spekulativ gegeben werden: Die URO-D ist ein Enzym der Hämbiosynthese. Diese verläuft unterschiedlich und voneinander unabhängig unter anderem in der Leber und im Knochenmark. Da die URO-D im Zytosol lokalisiert ist, gelangt sie auch in das Zytosol der Erythrozyten. Es besteht die Möglichkeit, daß die Penetranz der genetisch gebildeten URO-D in die Erythrozyten unterschiedlich ist.

Im Verlauf der Enzymstudien zur URO-D wurde deren Aktivität in Erythrozyten von AIP-Patienten bestimmt. Es ergab sich eine signifikante Aktivitätsminderung der URO-D um ca. 40 % im Vergleich zu Kontrollen. Diese Beobachtung einer verminderten URO-D-Aktivität bei AIP machte auch BRODIE et al. (19). Damit könnte das typische Porphyrinausscheidungsprofil mit Dominanz von URO im Urin von AIP-Patienten erklärt werden.

Die Beobachtung einer geringgradig erhöhten Aktivität der URO-S in den Erythrozyten der CHP/PCT-Patienten spricht für eine Kompensation des URO-D-Defektes (18, 163). Die erhöhte URO-S-Aktivität wurde mit verschiedenen Methoden nachgewiesen und auch in der vorliegenden Studie bestätigt (Tab.8.)

F. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es werden zwei klinisch-biochemische Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Uroporphyrinogen-I-Synthase (URO-S) und der Uroporphyrinogen-Decarboxylase (URO-D) in Erythrozyten erarbeitet. Beide Methoden erfüllen hinsichtlich der Präzision und Reproduzierbarkeit die Anforderungen an klinisch-biochemische Untersuchungen. Ihre Durchführung ist jedoch noch an Speziallaboratorien gebunden.

2. Die Bestimmung der URO-S wird im Mikromaßstab mit 10 µl Erythrozyten durchgeführt. Dabei werden zwei methodische Variationen verglichen. Vorher erhitzte Erythrozyten liefern im Vergleich zu nicht erhitzten besser reproduzierbare Ergebnisse. Die optimalen Inkubationsbedingungen dieser Variation sind ein pH-Wert von 7,4, eine Inkubationszeit zwischen 1 bis 3 Stunden und eine Substratkonzentration von 0,1 mmol PBG. Die Bestimmung des Inkubationsproduktes, Uroporphyrinogen, geschieht sowohl spektrophotometrisch als auch spektrofluorometrisch als Uroporphyrin.

3. Das Kollektiv der durchgeführten Aktivitätsbestimmung der URO-S umfaßt die Erythrozyten von 380 Patienten einschließlich 21 Patienten mit klinisch manifester akuter intermittierender Porphyrie. Der Normalbereich einer Stichprobe wird bei 61 $\pm$ 23 µmol/l·h ($\bar{x} \pm s$, n=302) unter Einschluß der Aktivitäten der Uroporphyrinogen-Cosynthase und der Folgeenzyme bzw. bei 65 $\pm$ 25 µmol/l·h ($\bar{x} \pm s$, n=274) nach Zerstörung der Uroporphyrinogen-Coxynthase und der Folgeenzyme durch Erhitzen des Hämolysats gefunden. Die Aktivität der URO-S bei Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie beträgt 35 $\pm$ 12 bzw. 40 $\pm$ 18 µmol/l·h und ist damit signifikant ($p < 0{,}001$) gegenüber Kontrollen erniedrigt.
4. Bei den 21 Fällen von akuter intermittierender Porphyrie ist die Diagnose schon vorher aufgrund der charakteristischen Konstellation der Porphyrinvorläufer- und Porphyrinausscheidung im Urin gestellt worden. Sowohl bei 7 der 21 Fälle von akuter intermittierender Porphyrie als auch bei 6 Verwandten der Kranken liegt die Aktivität der Uroporphyrinogen-Synthase in der Überlappungszone (40 bis 50 µmol/l·h). Bei 32 Verwandten von 9 Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie

ist die Aktivität der Uroporphyrinogen-Synthase in 22 Fällen signifikant erniedrigt, von denen 7 einen pathologischen Porphyrinvorläufer- und Porphyrinbefund im Urin aufweisen.

5. Die relative Aktivität der Uroporphyrinogen-Synthase bei Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie beträgt im Mittel ca. 60 %. Eine Erniedrigung der Uroporphyrinogen-Synthase-Aktivität über 30 % gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen ist somit ein sicheres Indiz für das Vorliegen des primären enzymatischen Defektes bei Genträgern für akute intermittierende Porphyrie.
6. Die Anwendung der Methode zur Aktivitätsbestimmung der Uroporphyrinogen-Synthase in Erythrozyten ist indiziert zur Diagnose und Differentialdiagnose einer akuten intermittierenden Porphyrie. Da bei vorhandenem Enzymdefekt und unauffälligen klinischen und klinisch-biochemischen Befunden eine Exacerbation der akuten intermittierenden Porphyrie durch endogene oder exogene Faktoren nicht auszuschließen ist, wird die Bestimmung der Uroporphyrinogen-Synthase als unumgängliche Präventivmaßnahme angesehen, die bei Auftreten

einer akuten intermittierenden Porphyrie bei allen Familienangehörigen durchgeführt werden sollte.

7. Die Aktivitätsbestimmung der Uroporphyrinogen-Decarboxylase erfordert eine Doppelinkubation. Durch eine Vorinkubation wird mit erythrozytärer Uroporphyrinogen-Synthase aus Porphobilinogen Uroporphyrinogen-I bereitet. Bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde wird Uroporphyrinogen zu 87 % als Isomer I in ausreichender Menge synthetisiert. Nach einer Hauptinkubation von einer weiteren Stunde wird das synthetisierte Koproporphyrinogen als Koproporphyrin dünnschichtchromatographisch herausgetrennt und spektrophotometrisch bestimmt.
8. Die Uroporphyrinogen-Decarboxylase wird im Erythrozytenhämolysat in einem Kollektiv von 191 Patienten bestimmt. In diesem Kollektiv befinden sich Proben von 71 Patienten mit chronischer hepatischer Porphyrie einschließlich der Porphyria cutanea tarda oder deren Familienangehörige. Die Diagnose chronisch hepatische Porphyrie bzw. Porphyria cutanea tarda ist aufgrund der klinischen Symptome

und der Porphyrinanalysen im Urin gestellt worden. Es wird eine Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase von 19,6 ± 3,1 µmol/l·h ($\bar{x}$ ± s) bei Kontrollen und 11,2 ± 3,3 µmol/l·h ($\bar{x}$ ± s) bei Patienten mit chronisch hepatischer Porphyrie einschließlich der Porphyria cutanea tarda gefunden. Im Mittel entspricht das 57 % der normalen Aktivität. Bei 12 Patienten mit klinisch und klinisch-biochemisch gesicherter chronisch hepatischer Porphyrie einschließlich Porphyria cutanea tarda liegt die Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase ebenfalls im Normalbereich. Familienstudien, die in einem Fall sogar vier Generationen umfassen, zeigen, daß dieser Enzymdefekt als autosomal dominant anzusehen ist. Ein Enzymdefekt hat auch hier nicht immer die klinische und biochemische Ausprägung einer Porphyria cutanea tarda zur Folge. Die korrelierenden Urinanalysen zeigen bei verminderter Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Aktivität Porphyrinmuster von der sekundären Koproporphyrinurie über alle Typen der chronischen hepatischen Porphyrie bis zur Porphyria cutanea tarda.

9. Der Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Defekt wird als primäre Ursache der biochemischen Abnormalität bei der Porphyria cutanea tarda angesehen. Aus diesem Grunde sollte bei Auftreten dieser Erkrankung die Aktivität der Uroporphyrinogen-Decarboxylase bei allen Familienangehörigen bestimmt werden, denn selbst aus einer sekundären Koproporphyrinurie kann sich bei einem Leberschaden und vorhandenem Enzymdefekt eine Porphyria cutanea tarda entwickeln. Parallel durchgeführte Urinanalysen verdeutlichen, daß Kinder im vorpubertären Alter bei vorhandenem Uroporphyrinogen-Synthase-Defekt selten pathologische Porphyrin- und Vorläuferausscheidungen haben, bei einem Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Defekt jedoch häufiger Porphyrinausscheidungen über die Norm hinaus aufweisen.
10. Pathobiochemische Erkenntnisse über den Einfluß der verminderten Uroporphyrinogen-Synthase-Aktivität auf die Hämbiosynthese lassen anhand früherer Enzymstudien in der Leber die akute intermittierende Porphyrie als eine "molekulare

Regulationskrankheit" erscheinen, da bei ihr die δ-Aminolävulinsäure-Synthase in der Leber induziert wird. Der Befund eines nur halb so großen K_M-Wertes in Erythrozyten von Patienten mit akuter intermittierender Porphyrie im Vergleich zu Kontrollen steht nicht im Widerspruch dazu. Die herabgesetzte erythrozytäre Uroporphyrinogen-Synthase-Aktivität greift jedoch nicht in die Regulation der Hämbiosynthese ein: sie ist Ausdruck des wahrscheinlich in allen Zellen und Organen vorhandenen Enzymdefektes. Die chronische hepatische Porphyrie einschließlich der Porphyria cutanea tarda wird hingegen als "Membrankrankheit" angesehen, da sie nur in Assoziation mit Leberzellschäden auftritt. Ein direkter Einfluß des Uroporphyrinogen-Decarboxylase-Defektes auf die Regulation der Hämbiosynthese wird hier nicht vermutet, da bei der experimentellen chronischen hepatischen Porphyrie die Induktion der δ-Aminolävulinsäure-Synthase nur gering ist und bei Patienten mit chronischer hepatischer Porphyrie die Ausscheidung der Porphyrinvorläufer in der Regel normal bleibt oder nur gering erhöht ist.

G. A U S B L I C K

Die durchgeführten enzymatischen Untersuchungen zur URO-S und zur URO-D haben einige weitere Einblicke in die Charakteristika der AIP und der CHP/PCT ermöglicht, sie haben jedoch auch Fragen offen gelassen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung des K_M-Wertes der URO-S in den Erythrozyten ergab unterschiedliche Werte bei AIP-Patienten und Patienten ohne Porphyrie. Dieser Befund stimmt einerseits mit Resultaten einiger anderer Autoren (158) überein, bleibt andererseits aber auch nicht unwidersprochen (115, 126, 189).

Die Porphyrin- und Hämbiosynthese findet in allen Geweben und Zellen statt. Die Aktivität der URO-S in den Erythrozyten kann nur die Enzymverhältnisse im erythropoetischen System widerspiegeln, nicht aber in der Leber. Um die pathobiochemischen Hintergründe der AIP noch sicherer aufklären zu können, erscheint es sinnvoll, den K_M-Wert der URO-S nach deren Isolierung und Reinigung aus

Erythrozyten und Leber zu untersuchen. Eine Isolierung und Reinigung des Enzyms erscheint wichtig, um Interferenzen der URO-S mit anderen Zellbestandteilen auszuschließen.

Ein tierexperimentelles Modell, in dem die enzymatischen Defekte und Defektfolgen der AIP vollständig imitiert wurden, ist bisher nicht bekannt. Es konnte durch Allyl-isopropylacetamid (AIA) im Rattenexperiment die ALS-S induziert (99, 100, 140, 205) und somit die AIP partiell imitiert werden. Dies hatte eine erhöhte Porphyrin- und Vorläuferausscheidung im Urin zur Folge, wie sie auch bei der AIP des Menschen beobachtet wird. Eine Bestimmung der URO-S-Aktivität und deren K_M-Wert in der Leber von AIA-belasteten Ratten im Vergleich zu Kontrollen könnte klären, ob die URO-S durch exogene Substanzen beeinflußbar ist oder ob ihre Aktivität nur genetisch determiniert wird.

Der URO-D-Defekt wird als primäre Ursache der Störung des Porphyrinstoffwechsels in der CHP/PCT angesehen. Eine Leberzellschädigung ist mit dieser Erkrankung immer assoziiert. Familienstudien lassen einen genetischen Enzymdefekt erkennen. Das Vorkommen klinisch und biochemisch

gesicherter Fälle von PCT mit normaler URO-D-Aktivität scheint einer genetisch bedingten Enzymstörung zu widersprechen. Durch experimentelle Untersuchungen von Hexachlorbenzol (HCB) belasteten Versuchstieren sollten Aktivitätsbestimmungen der URO-D in den Erythrozyten durchgeführt werden. Mit Inkubationsversuchen an Leberhomogenaten von HCB-Ratten ließ sich ein URO-D-Defekt nachweisen (Synthesestudien aus PBG). Der Nachweis eines Enzymdefektes sowohl in der Leber wie in den Erythrozyten würde eine Duplizität der Genese dieser Erkrankungen bedeuten: einerseits sind sie genetisch bedingt, andererseits können sie durch exogene Faktoren erworben werden.

Der direkte Einfluß von HCB oder Metabolite dieses Stoffes auf die isolierte URO-D sollte überprüft werden, um zu klären, ob der exogene Einfluß das Enzym direkt betrifft oder nur indirekt über eine Zerstörung der Zellmembran und anderer Organelle.

Eine weitere Substanz, die Zellveränderungen in der Leber hervorruft und die als Manifestationsfaktor der CHP bekannt ist, der Äthylalkohol, sollte

in einem ähnlichen Tierexperiment getestet werden. Hier würde eine Aktivitätsverminderung der URO-D im Lebergewebe und in den Erythrozyten sowohl die Duplizität der Genese einer CHP/PCT im Sinne des HCB-Versuchs als auch die Entwicklung der klinisch manifesten PCT bei genetisch bedingtem URO-D-Defekt durch Potenzierung beider Effekte erklären.

In AIP-Erythrozyten wurde die URO-D-Aktivität vermindert gefunden. Diese Beobachtung erklärt die Dominanz von URO in der Urinporphyrinausscheidung. Die Frage, ob diese Aktivitätsverminderung in allen Phasen der AIP bestehen bleibt, ist noch offen, zumal bei Urinanalysen gerade in der Remission der AIP eine Umkehr der URO-KOPRO-Verhältnisse festgestellt werden konnte (67). Falls die URO-D-Aktivität in diesem Falle vermindert bleibt, ist durch Familienstudien zu prüfen, ob auch dieser Enzymdefekt genetisch bedingt ist oder ob es sich hier um einen regulatorischen Effekt handelt.

H. L I T E R A T U R

1) BARNES, R., M.S. JONES, O.T.G. JONES und R.J. PORRA:
Ferrochelatase and δ-aminolaevulate synthetase in brain, heart, kidney and liver of normal and porphyric rats.
Biochem. J. 124 (1971) 633-637

2) BATTLE, A.M.DEL C. und M. GRINSTEIN:
Porphyrin biosynthesis. Phyriaporphyrinogen III, a normal intermediate in the biosynthesis of protoporphyrin IX.
Biochim. biophys. Acta. 62 (1962) 197-200

3) BAUMSTARK, F.:
Zwei pathologische Harnfarbstoffe.
Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 9
(1874) 568-584

4) BECKER, D.M., J.D. VILJOEN, J. KATZ und S. KRAMER:
Reduced ferrochelatase activity: a defect common to porphyria variegata and Protoporphyria.
Brit. J. Haematol. 36 (1977) 171-179

5) BERLIN, N.J., A. NEUBERGER und J.S. SCOTT:
The metabolism of δ-aminolevulinic acid.
Biochem. J. 64 (1956) 90-100

6) BERLIN, A. und K.H. SCHALLER:
European standardized method for the determination of δ-aminolevulinic acid dehydratase activity in blood.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 (1974) 389-390

7) BIEMPICA, L., N. KOSOWER, M.H. MA und S. GOLDFISCHER:
Hepatic porphyrias. Cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda.
Arch. Pathology 98 (1974) 336-343

8) BLECKENHORST, G.H., N.R. PIMSTONE und L. EALES:
Porphyria cutanea tarda in South Africa. Metabolic basis of disordered haem biosynthesis.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 299-311

9) BLECKENHORST, G.H., N.R. PIMSTONE, B.L. WEBBER und L. EALES:
Hepatic haem metabolism in porphyria cutanea tarda (PCT): Enzymatic studies and their relation to liver ultrastructure.
Ann. Clin. Res. 8 (suppl. 17) (1976) 108-121

10) BOCK, K.W., E. KRAUSS und W. FRÖHLING:
Regulation of δ-aminolevulinic acid synthetase by drugs and steroids in vivo and in isolated perfused rat liver.
Europ. J. Biochem. 23 (1971) 366-371

11) BOCK, K.W., R. WEINER und W. FRÖHLING:
Regulation of δ-aminolevulinic acid synthetase by drugs and steroids in isolated perfused rat liver.
Enzyme 16 (1973) 295-301

12) BOGORAD, L.:
The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen.
J. biol. Chem. 233 (1958) 501-509

13) BOGORAD, L.:
The enzymatic synthesis of porphyrins from porphobilinogen III. Uroporphyrinogens as intermediates.
J. biol. Chem. 233 (1958) 516-519

14) BONKOWSKY, H.L., D.P. TSCHUDY, E.C. WEINBACH, P.S. EBERT und J.M. DOHERTY:
Porphyrin synthesis and mitochondrial respiration in acute intermittent porphyria: studies using cultured human fibroblasts.
J. Lab. Clin. Med. 85 (1975) 93-102

15) BORST, M. und H. KÖNIGSDÖRFER:
Untersuchungen über Porphyrie.
S. Hirzel, Leipzig (1929)
Zit. nach 222

16) BOTTOMLEY, S.S.:
Characterization and measurement of heme synthetase in normal human bone marrow.
Blood 31 (1968) 314-322

17) BRODIE, M.J., M.R. MOORE und A. GOLDBERG:
Enzyme abnormalities in the porphyrias.
The Lancet (1977) 699-701

18) BRODIE, M.J., M.R. MOORE, G.G. THOMPSON, B.C. CAMPBELL und A. GOLDBERG:
Is porphobilinogen deaminase activity a secondary control mechanism in haem biosynthesis in humans?
Biochem. Soc. Transactions 5 (1977) 1466-1468

19) BRODIE, M.J., M.R. MOORE, G.G. THOMPSON und A. GOLDBERG:
The treatment of acute intermittent porphyria with laevulose.
Clin. Sci. Mol. Med. 53 (1977) 365-371

20) BRODIE, M.J., G.G. THOMPSON, M.R. MOORE, A.D. BEATTIE und A. GOLDBERG:
Hereditary coproporphyria. Demonstration of the abnormalities in haem biosynthesis in peripheral blood.
The Quarterly Journal of Medicine 46 (1977) 229-241

21) BRUGSCH, J.:

Porphyrine

Johann Ambrosius Barth Verlag,

Leipzig (1959)

Zit. nach 161

22) BRUGSCH, J.:

Die klinische Bedeutung der Porphyrien.

Z. klin. Chem. 6 (1968) 321-323

23) BURNHAM, B.F.:

Metabolism of porphyrins and corrinoids.

3. Biosynthesis of uroporphyrinogen III.

In: D.M. GREENBERG (Hrsg.): Metabolic

Pathways. Amino Acids and Tetrapyrrols.

Academic Press. Inc. New York 3 (1969)

429-435)

24) BURNHAM, B.F. und J. LASCELLES:

Control of porphyrin biosynthesis through

a negative feedback mechanism.

Biochem. J. 87 (1963) 462-472

25) CAMPBELL, J.A.H.:
Pathological aspects of hexachlorobenzene feeding in rats.
Sth. afr. J. lab. clin. Med. 9
(1963) 203-206

26) CHEN, T.C. und G.W. MILLER:
Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves.
Plant u. Cell Physiol. 15 (1974)
993-1005

27) DEAN, G.:
The porphyrias.
Brit. med. Bull. 25 (1969) 48-51

28) DEHLIN, O., L. ENERBÄCK und O. LUNDVALL:
Porphyria cutanea tarda - a genetic disease? A biochemical and fluorescence microscopial study in four families.
Acta Med. Scand. 194 (1973) 265-270

29) DE MATTEIS, F.:
Drug interactions in experimental hepatic porphyria.
Enzyme 16 (1973) 266-275

30) DE MATTEIS, F. und B.E. PRIOR:
Experimental hepatic porphyria caused by feeding 3,5 - diethoxy carbonyl - 1,4 - dihydro - 2,4,6 - trimethylpyridine. Comparisation with sedormid porphyria.
Biochim. J. 83 (1962) 1-8

31) DE MATTEIS, F., R.F. SLATER und D.Y. WANG:
Liver nucleotides in experimental hepatic porphyria.
Biochem. biophysica Acta 68 (1963) 100-107

32) DOSS, M.:
Habilitationsschrift
Marburg/L. 1969

33) DOSS, M.:
Zur Wirkung von Oestradiol und Progesteron auf die Porphyrinsynthese in Leberzellkulturen.
Klin. Wschr. 47 (1969) 228-229

34) DOSS, M.:
Porphyrinanalyse im Leberzylinder bei Porphyria cutanea tarda.
Klin. Wschr. 47 (1969) 1280-1282

35) DOSS, M.:

Trennung, Isolierung und Bestimmung von Proto-, Kopro-, Pentacarboxy-, Hexacarboxy-, Heptacarboxy- und Uroporphyrin.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 499-502

36) DOSS, M.:

Analytical and preparative thin-layer chromatography of porphyrin methyl esters.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 8 (1970) 197-207

37) DOSS, M.:

Die Porphyrine in der Leber und im Urin bei Porphyria cutanea tarda.
Dtsch. med. Wschr. 95 (1970) 959-960

38) DOSS, M.:

Pathobiochemie angeborener und erworbener Porphyrien.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 351 (1970) 1300-1301

39) DOSS, M.:

Urinary porphyrin pattern in hepatic porphyrias.
Klin. Wschr. 49 (1971) 939-940

40) DOSS, M.:

Suggested pathobiochemical development of chronic hepatic porphyrias.
Klin. Wschr. 49 (1971) 941-942

41) DOSS, M.:

Metabolism of δ-aminolaevulinic acid and porphobilinogen in human erythrocytes in acute intermittent porphyria.
Enzyme 16 (1973) 343-353

42) DOSS, M.:

Porphyrins and porphyrin precursors.
In: H. Ch. CURTIUS und M. ROTH (Hrsg.): Clinical Biochemistry, Principles and Methods; Walter de Gruyter, Berlin-New York, Vol. II (1974) 1323-1371

43) DOSS, M.:

Porphyria cutanea praematura durch hormonelle Kontrazeptiva.
Dtsch. Med. Wschr. 23 (1977) 875-877

44) DOSS, M.

Klinische Biochemie der Porphyrien: Porphyrine in Forschung und Klinik. Inn. Med. 4 (1977) 5-11 und 43-50

45) DOSS, M.:

Differenzierung der Porphyrien und Porphyrinstoffwechselstörungen. Krankenhausarzt 50 (1977) 110-114

46) DOSS, M.:

Differentialdiagnose und Therapie der akuten intermittierenden Porphyrie (AIP). Krankenhausarzt 50 (1977) 209-216

47) DOSS, M.:

Differentialdiagnose und Therapie der chronischen hepatischen Porphyrien (CHP) einschließlich der Porphyria cutanea tarda (PCT). Krankenhausarzt 50 (1977) 313-324

48) DOSS, M.:

Pathobiochemie der Porphyrien. Med. Klin. 72 (1977) 1501-1518

49) DOSS, M.:und U. BODE:
Analyse der Erythrozytenporphyrine.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.
6 (1968) 383-386

50) DOSS, M., D. LOOK, H. HENNING, C.J. LODERS, W. DÖLLE und G. STROHMEYER:
Chronische hepatische Porphyrien.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.
9 (1971) 471-477

51) DOSS, M. und W. MANNHEIM:
Dünnschichtchromatographische Methode zur Isolierung und Bestimmung der Porphyrine im Urin.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.
5 (1967) 260-264

52) DOSS, M. und W. MEINHOF:
Differenzierung hepatischer Porphyrinurien.
Dtsch.med. Wschr. 96 (1971) 1006-1013

53) DOSS, M., W. MEINHOF, D. LOOK, H. HENNING, P. NAWROCKI, W. DÜLLE, G. STROHMEYER und L. FILIPPINI:
Porphyrins in liver and urine in acute intermittent and chronic hepatic porphyrias.
Sth. afr. med. J. (Special issue) 45 (1971) 50-54

54) DOSS, M., W. MEINHOF, H. MALCHOW, C.-P. SODOMANN und W. DÜLLE:
Charakteristische Konstellation der Urinporphyrine als biochemischer Index der Porphyria cutanea tarda.
Klin. Wschr. 48 (1970) 1132-1134

55) DOSS, M. und W.-K. PHILIPP:
Zwei einfache spezifische Methoden zur Bestimmung der Urinporphyrine.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.
7 (1969) 148-151

56) DOSS, M. und E. SCHERMULY:
Urinary porphyrin excretion pattern and isomer distribution of I and III in human porphyrin disorders.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 189-204

57) DOSS, M., E. SCHERMULY und G. KOSS:
Hexachlorobenzene porphyria in rats as a model for human chronic hepatic porphyrias.
Ann. Clin. Res. 8 suppl. 17 (1976) 171-181

58) DOSS, M., E. SCHERMULY, D. LOOK und H. HENNING:
Enzymatic defects in chronic hepatic porphyrias.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 286-298

59) DOSS, M., E. SCHERMULY, D. LOOK, H. HENNING, V. HOCEVAR, K. DOHMEN und M. ANLAUF:
Studies on the metabolism of δ-amino-laevulinic acid and porphobilinogen in liver biopsies from patients with acute intermittent porphyria.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 205-216

60) DOSS, M. und A. SCHMIDT:
Quantitative Bestimmung von δ-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustauschchromatographie-Fertigsäulen.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 9 (1971) 99-102

61) DOSS, M., G. STROHMEYER, D. LOOK, H. HENNING, P. NAWROCKI, R. EGBRING, A. SCHMIDT, G. KORB, C.J. LÖDERS, E. KRIEN, G. ZEITLER und A. LUCHMANN:
Chronic hepatic porphyria Type C.
Klin. Wschr. 49 (1971) 773-776

62) DOSS, M., R. v. TIEPERMANN, E. SCHERMULY, B. SCHEFFER und G.A. MARTINI:
Primary liver carcinoma assoziated with porphyria cutanea tarda and uroporphyrinogen decarboxylase defect in erythrocytes.
In. M. DOSS and P. NAWROCKI (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases - Report of the Discussions.
Dr. Falk, Freiburg (1976) 222-237

63) DOSS, M. und R. v. TIEPERMANN:
Enzymopathie der Porphyrinsynthese in Erythrozyten bei akuter hepatischer Porphyrie.
Laboratoriumsmedizin 2 (1977) 28-32

64) DOSS, M. und R. v. TIEPERMANN:
Uroporphyrinogen-Synthase in Erythrozyten bei akuter intermittierender Porphyrie: Neue pathobiochemische Aspekte.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 111-118

65) DOSS, M. und R. v. TIEPERMANN:
Biochemical and clinical relationships among the hereditary acute hepatic porphyrias: new concepts.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 34-35

66) DOSS, M. und R. v. TIEPERMANN:
Biochemical and clinical transitions between the hereditary hepatic porphyrias: new concepts.
In: M. DOSS (Hrsg.): Diagnosis and Therapie of Porphyrias and Lead Intoxication.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York
im Druck

67) DOSS, M. und R. v. TIEPERMANN:
Unveröffentliche Ergebnisse.

68) DOSS, M. und L. WETTERBERG:
Verbotene und erlaubte Medikamente bei akuter hepatischer Porphyrie.
Fortschr. Med. 95 (1977) 2531-2536

69) DOWDLE, E., P. GOLDSWAIN, N. SPONG und L. EALES:
The pattern of porphyrin isomer accumulation and excretion in symptomatic porphyria.
Clin. Sci. 39 (1970) 147-158

70) EALES, L. und E.B. DOWDLE:
Clinical aspects of importance in the porphyrias.
Brit. J. clin. Pract. 22 (1968) 505-515

71) ELDER, G.H., J.O. EVANS und S. MATLIN:
The porphyrinogenic action of polychlorinated hydrocarbons.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 424-431

72) ELDER, G.H., J.O. EVANS, N. THOMAS, R. COX, M.J. BRODIE, M.R. MOORE, A. GOLDBERG und D.C. NICHOLSON:
The primary enzyme defect in hereditary coproporphyria.
Lancet 4 (1976) 1217-1219

73) FALK, J.E.:
Porphyrins and Metalloporphyrins.
Elsevier, Amsterdam (1964)
a) S. 129-135
b) S. 161-163
c) S. 232-246

74) FALK, J.E., E.I.B. DRESEL und C. RIMINGTON:
Porphobilinogen as a precursor, and interconversion of porphyrins, in a tissue system.
Nature 172 (1953) 292-294

75) FELSHER, B.F. und J.P. KUSHNER:
Hepatic siderosis and porphyria cutanea tarda: relation of iron excess to the metabolic defect.
Sem. Hematol. 14 No 2 (1977) 243-251

76) FILIPPINI, L.:
Die Therapie der akut intermittierenden Porphyrie.
Dtsch. Med. Wschr. 91 (1966) 959-961

77) FILIPPINI, L.:
Die akut intermittierende Porphyrie.
Intern. Praxis 8 (1968) 575-587

78) FISCHER, H.:
Beobachtungen am frischen Harn und Kot von Porphyrinpatienten.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 97 (1916) 148-170

79) FISCHER, H., H. HILMER, F. LINDNER und B. POTZER:
Chemische Befunde bei einem Fall von Porphyrinurie.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 150 (1925) 44-101

80) FRIEDENREICH, A.:
To tilfaelde af dødelig Sulfonalforgiftning.
Hospitalstidende 10 (1892) 704-718

81) FRYDMAN, B., R.B. FRYDMAN, A. VALASINAS, E.S. LEVY und G. FEINSTEIN:
Biosynthesis of uroporphyrinogens from porphobilinogen: mechanism and the nature of the process.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273 (1976) 137-160

82) FRYDMAN, R.B., A. VALASINAS und B. FRYDMAN:
Mechanism of Uroporphyrinogen biosynthesis from Porphobilinogen.
Enzyme 16 (1973) 151-159

83) GIBSON, K.D., A. NEUBERGER und J.J. SCOTT:
The purification and properties of δ-aminolaevulinic acid dehydratase.
Biochem. J. 61 (1955) 618-629

84) GINSBURG, A.D. und E.B. DOWDLE:
Biochemical changes in dicarbethoxy-dihydrocollidine-induced porphyria in the rats.
Sth. afr. J. lab. clin. Med. 9 (1963) 206-211

85) GOLDBERG, A. und C. RIMINGTON:
Diseases of prophyrin metabolism.
Charles C. Thomas Publisher, Springfield, I 11. USA (1962)
Zit. nach 161

86) GRANDCHAMP, B., M. GRELIER und Y. NORDMANN:
Porphyrie aigue intermittente. Dêtection des porteurs asymptomatiques de la tare.
Nouv Presse Mêd. 4 (1975) 1801-1802

87) GRANDCHAMP, B., N. PHUNG, M. GRELIER und Y. NORDMANN:
The spectrophotometric determination of uroporphyrinogen-I-synthase activity.
Clin. Chim. Acta. 70 (1976) 113-118

88) GRANICK, S.:
A test for detection of porphyria-inducing drugs.
J. amer. med. Ass. 190 (1964) 475-475

89) GRANICK, S.:
The induction in vitro of the synthesis of δ-aminolaevulinic acid synthetase in chemical porphyria: A response to certain drugs, sex hormones, and foreign chemicals.
J. biol. Chem. 241 (1966) 1359-1375

90) GRANICK, S. und A. KAPPAS:
Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture. I. Structural basis and possible physiological role in the control of heme formation.
J. biol. Chem. 242 (1967) 4587-4593

91) GRANICK, S. und D. MAUZERALL:
Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting δ-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen.
J. biol. Chem. 232 (1958) 1119-1140

92) GRANICK, S. und G. URATA:
Increase in activity of δ-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine.
J. biol. Chem. 238 (1963) 821-827

93) GRAY, C.H.:
Porphyrias.
In: THOMPSON, R.H.S., J.D.P. WOOTTON (Hrsg.): Biochemical Disorders of Human Disease.
London (1970) 215 Zit. nach 52

94) GRELIER, M., B. GRANDCHAMP, N. PHUNG, H. de VERNEUIL, J. NOIRE, Y. NORDMANN, H. HUSQUINET und P. DODINVAL:
Detection de la porphyrie aigue intermittente par le dosage de l'urosynthétase.
La Nouvelle Presse médicale 6 (1977) 1045-1047

95) GONTHER, H.:
Die Hämatoporphyrie.
Dtsch. Arch. f. klin. Med. 15 (1911)
89-146

96) GONTHER, H.:
Hämatoporphyrie.
Dtsch. Med. Wschr. 37 (1911) 1771-1771

97) HADGER-ARONSON, B.:
Porphyria induced in the rabbit by diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-dicarboxylate.
Acta pharmacol et toxicol. 18 (1961)
165-169

98) HAEGER, B.:
Urinary δ-aminolaevulinic acid and porphobilinogen in different types of porphyria.
Lancet 11 (1958) 606-608

99) HAYASHI, N., Y. KURASHIMA und G. KIKUCHI:
Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of δ-aminolevulinate synthetase in liver mitochondria.
Arch. Biochem. Biophys. 148 (1972) 10-21

100) HAYASHI, N., B. YODA und G. KIKUCHI:
Mechanism of allylisopropylacetamide-induced increase of δ-aminolevulinate synthetase in liver mitochondria. II. Effects of hemin and bilirubin on enzyme induction.
J. Biochem. 63 (1968) 446-452

101) HELD, H.:
Effect of alcohol on the heme and porphyrin synthesis interaction with phenobarbital and pyrazole.
Digestion 15 (1977) 136-146

102) HENNING, H., H.M. VOGEL, M. DOSS und C.J. LODERS:
Chronische hepatische Porphyrie: Biochemische und histologische Befunde.
Diagnostic 9 (1976) 275-278

103) HERNBERG, S., F. SAKARI, J. NIKKANEN und S. VALKONEN:
Erythrocyte δ-aminolevulinic acid dehydratase in new lead exposure.
Arch. Environ Health. 25 (1972) 109-113

104) HOPMANN, R.:
Akute intermittierende ovulozyklische Porphyrie und ihre Behandlung.
Dtsch. Med. Wschr. 93 (1968) 76-81

105) HOPPE-SEYLER, F.:
Das Hämatin.
Tübinger Med. Chem. Untersuch. 4 (1871) 523-533

106) JOUBERT, S.M., J.J.F. Taljaard, B.C. SHANLEY:
Aetiological relationship between hepatic siderosis and symptomatic porphyria cutanea tarda.
Enzyme 16 (1973) 305-313

107) KAPPAS, A. und S. GRANICK:
Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture. II. The effects of heme, uridine diphosphate glucuronid acid, and inhibitors of nucleic acid and protein synthesis on the induction process.
J. biol. Chem. 243 (1968) 346-351

108) KAPPAS, A., S. SASSA, S. GRANICK und H.L. BRADLOW:
Endocrine-gene interaction in the pathogenesis of acute intermittent porphyria.
In: F. Plum (Hrsg.): Brain Dysfunction in Metabolic Disorders
Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis. 53
Raven Press, New York (1974) 225-237

109) KAPPAS, A., C.S. SONG, R.D. LEVERE, R.A. SACHSON und S. GRANICK:
The induction of δ-aminolevulinic acid synthetase in vivo in chick embryo liver by natural steroids.
Proc. nat. Acad. Sci. USA 61 (1969) 509-513

110) KAUFMANN, L. und H.S. MARVER:
Biochemical defects in two types of human hepatic porphyria.
New Engl. J. Med. 283 (1970) 954-958

111) KIKUCHI, G., H.J. KIM, K. WATARAI, Y. TOMITA und A. OHASHI:
Comparative study on induction of hepatic δ-aminolevulinate synthetase by different drugs.
Enzyme 16 (1973) 258-266

112) KLIMPEL, D., J. DITTRICH, R. v. TIEPERMANN und M. DOSS:

Acute intermittent porphyria and cerebral attacks in childhood.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 45-46

113) KRASNER, N., M.R. MOORE, G.G. THOMPSON, W. McINTOSH und A. GOLDBERG:

Depression of erythrocyte δ-aminolaevulinic acid dehydratase activity in alcoholics.
Clin. Sci. Mol. Med. 46 (1974) 415-418

114) KREIMER-BIRNBAUM, M.:

Review of the present status of the uroporphyrinogen synthase (URO-S) assay and its applicability to the early detection of carriers of acute intermittent porphyria.
In: M. DOSS und P. NAWROCKI (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases. Report of the Discussions.
Dr. Falk, Freiburg (1976) 146-154

115) KREIMER-BIRNBAUM, M.:
Uroporphyrinogen synthase in human blood: Developmental studies.
Life Sci. 17 (1976) 1473-1478

116) KREIMER-BIRNBAUM, M. und M.J. TOMIO:
Studies on uroporphyrinogen synthase from human erythrozytes.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 182-188

117) KUSHNER, J.P. und A.J. BARBUTO:
Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase (urodecarb) in porphyria cutanea tarda (PCT).
Abstract. Clin. Res. 22 (1974) 178-178

118) KUSHNER, J.P., A.J. BARBUTO, G.R. LEE:
Inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda-decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity.
J. Clin. Invest. 58 (1976) 1089-1097

119) KUSHNER, J.P., D.P. STEINMÜLLER und G.R. LEE:
The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. II. Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase.
J. Clin. Invest. 56 (1975) 661-667

120) LEONHARDT, K.F., R. v. TIEPERMANN und M. DOSS:
Family studies on acute intermittent porphyria: neurological, biochemical and genetic investigations.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 42-43

121) LEVIN, E.Y.:
Uroporphyrinogen III cosynthase from mouse spleen.
Biochemistry 7 (1968) 3781-3788

122) LINEWEAVER, H. und D. BURK:
Determination of enzyme dissoziation constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56 (1934) 658-666

123) LOOK, D. und M. DOSS:
Fluorescence and biochemical findings in liver biopsies in chronic hepatic porphyrias.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 325-327

124) LUI, H. und G.D. SWEENY:
Hepatic metabolism of hexachlorobenzene.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Abstr. I. Int. Porphyrin Meet. Freiburg (1975) 65-65

125) LUNDVALL, O. und L. ENERBÄCK:
Hepatic fluorescence in porphyria cutanea tarda studied in fine needl aspiration biopsy smears.
J. clin. Path. 22 (1969) 704-709

126) MAGNUSSEN, C.R., J.B. LEVINE, J.M. DOHERTY, J.O. CHEESMAN und D.P. TSCHUDY:
A red cell enzyme method for the diagnosis of acute intermittent porphyria.
Blood 44 (1974) 857-868

127) MARVER, H.S., A. COLLINS und D.P. TSCHUDY:
The 'permissive' effect of hydrocortisone on the induction of δ-aminolaevulate synthetase.
Biochem. J. 99 (1966) 31-33c

128) MARVER, H.S., A. COLLINS, D.P. TSCHUDY und M. RECHEIGL:
δ-Aminolevulinic acid synthase.
II. Induction in rat liver.
J. biol. Chem. 241 (1966) 4323-4329

129) MARVER, H.S., R. SCHMID und H. SCHOTZEL:
Heme and methemoglobin: naturally occuring repressors of microsomal cytochrome.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33 (1968) 969-974

130) MAUZERALL, D. und S. GRANICK:
The occurence and determination of δ-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine.
J. biol. Chem. 219 (1956) 435-446

131) MAUZERALL, D. und S. GRANICK:
Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase.
J. biol. Chem. 232 (1958) 1141-1162

132) MELGAARD, B., J. CLAUSEN und S.C. RASTOGI:
Heavy metal levels and delta-amino-levulinic acid dehydratase levels in peripheral polyneuropathy.
Acta Neurol. Scandinav. 53 (1976) 291-307

133) MEYER, U.A.:
Intermittent acute porphyria. Clinical and biochemical studies of disordered heme biosynthesis.
Enzyme 16 (1973) 334-342

134) MEYER, U.A., L.J. STRAND, M. DOSS, A.C. REES und H.S. MARVER:
Intermittent acute porphyria-demonstration of a genetic defect in porphobilinogen metabolism.
New. Engl. J. Med. 286 (1972) 1277-1282

135) MOORE, M.R., D. BARNADO, I.A. MAGNUS, A.L. TURNBULL, A.D. BEATTIE, A. GOLDBERG:
Hepatic δ-aminolaevulinic acid synthetase activity in porphyria cutanea tarda.
Lancet II (1972) 97-100

136) MUSTAJOKI, P.:
Red cell uroporphyrinogen I synthetase in acute intermittent porphyria.
Ann. Clin. Res. 8 suppl. 17 (1976) 133-138

137) NEUBERGER, A. und J.J. SCOTT:
Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis.
Nature 172 (1953) 1093-1094

138) NORDMANN, Y, B. GRANDCHAMP, N. PHUNG, H. de VERNEUIL, M. GRELIER und J. NOIRE:
Coproporphyrinogen-oxidase defiency in hereditary copropörphyria
The Lancet 1 (1977) 140-140

139) OCKNER, R.K. und R. SCHMID:
Acquired porphyria in man and rat due to hexachlorobenzene intoxikation.
Nature 189 (1961) 499-499

140) PADMANABAN, G., M.R. SATYANARAYANA RAO und K. MALATHI:
A model for the regulation of δ-amino-laevulinate synthetase induction in rat liver.
Biochem. J. 134 (1973) 847-857

141) PERLROTH, M.G. H.S. MARVER, D.P. TSCHUDY:
Oral contraceptive agents and the management of acute intermittent porphyria.
J. amer. med. Ass. 194 (1965) 1037-1042

142) PERROT, H. und J. THIVOLET:
Le rôle de l'hérédite´dans la porphyrie cutanée tardive dite acquise; â propos d'une forme familiale.
Ann. Derm. Syph. (Paris) 97 (1970) 5-14

143) PETERS, H.A., D.J. Cripps und H.H. REESE:
Porphyria: Theories of etiology and treatment.
Int. Rev. Neurobiol. 16 (1974) 301-355

144) PETERSON, A., I. BOSSENMAIER, R. CARDINAL, C.J. WATSON:
Hematin treatment of acute porphyria.
Early Remission of an almost fatal relapse.
J. Amer. med. Ass. 235 (1976) 520-522

145) PETERSON, L.R., P. Hamernyik, Th.D. BIRD und R.F. LABBE:
Erythrocyte uroporphyrinogen I synthase activity in diagnosis of acute intermittent porphyria.
Clin. chem. 22 (1976) 1835-1840

146) PIMSTONE, N.R., G. BLECKENHORST, L. EALES:
Enzymatic defects in hepatic porphyria.
Enzyme 16 (1973) 354-366

147) PINELLI, A. und L. FAVALLI:
Antilipaemic and antiporphyric activity of nicotinic acid in allylisopropylacetamide-treated rats.
Biochim. Biophys. Acta 279 (1972) 316-319

148) PORRA, R.J. und J.E. FALK:
The enzymatic conversation of copro-porphyrinogen III into protoporphyrin IX.
Biochem. J. 90 (1963) 69-75

149) REMMER, H. und H.J. MERKER:
Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug-metabolizing enzymes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 123 (1965) 79-97

150) RICK, W.:
Statistische Qualitätskontrolle
In: W. RICK: Klinische Chemie und Mikroskopie. 4. Aufl.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1976) 382-383

151) RIMINGTON, C.:
Drug and enzyme interactions in the porphyrias.
Proc. roy. Soc. Med. 57 (1964) 511-514

152) RIMINGTON, C., P.N. MORGAN, K. NICHOLS, J.D. EVERALL und R.R. DAVIES:
Griseofulvin administration and porphyrin metabolism. A. Survey.
Lancet ii (1963) 318-322

153) ROMEO, G. und E.Y. LEVIN:
Uroporphyrinogen decarboxylase from mouse spleen.
Biochim. Biophys. Acta 230 (1971) 330-341

154) SANDBERG, C.G. und L. WETTERBERG:
Porphyrin precursors in sulfanilamidopyridin treatment.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 20 (1967) 176-178

155) SAN MARTIN de VIAK, L.C. und M. GRINSTEIN:
Porphyrin biosynthesis. IV 5- and 6-COOH porphyrinogens (type III) as normal intermediates in haem biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 158 (1968) 79-91

156) SASSA, S. und S. GRANICK:
Induction of -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cells in culture.
Proc.nat.Acad.Sci., USA 67 (1970) 517-522

157) SASSA, S., S. GRANICK, D.R. BICKERS, R.D. LEVERE und A. KAPPAS:
Studies on the inheritance of human erythrocyte δ-aminolevulinate dehydratase and uroporphyrinogen synthetase.
Enzyme 16 (1973) 326-333

158) SASSA, S., S. GRANICK, D.R. BICKERS, H.L. BRADLOW und A. KAPPAS:
A microassay for uroporphyrinogen I synthase, one of three abnormal enzyme activities in acute intermittent porphyria, and its application to the study of the genetics of this disease.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71 (1974) 732-736

159) SASSA, S., S. GRANICK und A. KAPPAS:
Effect of lead and genetic factors on heme biosynthesis in the human red cell.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 244 (1975) 419-440

160) SASSA, S., G. SOLISH, R.D. LEVERE und A. KAPPAS:
Studies in porphyria. IV. Expression of the gene defect of acute intermittent porphyria in cultured skin fibroblasts and amniotic cells: Prenatal diagnosis of the porphyric trait.
J. Exp. Med. 142 (1975) 722-731

161) SCHÄFER - SCHERMULY, E.:
Porphyrinbiosynthese aus δ-Aminolävulinsäure und Porphobilinogen bei chronischen Porphyrinstoffwechselstörungen sowie angeborenen hepatischen Porphyrien.
Inaugural-Dissertation Marburg (1975)
151-177

162) SCHERMULY, E. und M. DOSS:
Separation of the coproporphyrin isomers I and III by thin-layer chromatography.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975)
299-304

163) SCHERMULY, E. und M. DOSS:
Porphyrin biosynthesis from ALA and PBG by human erythrocytes in porphyrin disorders. Kinetic studies of the isomer series I and III.
Ann. Clin. Res. 8 suppl. 17 (1976)
92-102

164) SCHLEY, G., M. ANLAUF und K.D. BOCK:
Akute intermittierende Porphyrie.
Med. Klin. 71 (1976) 1891-1897

165) SCHMID, R.:
Hepatoxic drugs causing porphyria in man and animals.
Sth. afr. J. lab. clin. Med. 9 (1963) 212-220

166) SCHMID, R.:
The porphyrias.
In: STANBURY, J.B., J.B. WYNGARDEN, D.S. FREDRICKSON (Hrsg.): The Metabolic Basis of Inherited Disease.
New York, Toronto, Sydney, London (1966) 813-870

167) SCHMID, R., J.F. FIGEN und S. SCHWARTZ:
Experimental porphyria. IV Studies on liver catalase and other heme enzymes in sedormid porphyria.
J. biol. Chem. 217 (1955) 263-274

168) SCHMID, R. und S. SCHWARTZ:
Experimental porphyria. III. Hepatic type produced by sedormid.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 81 (1952) 685-689

169) SCHMID, R. und S. SCHWARTZ:
Studies of some liver heme proteins and porphyrins in experimental sedormid porphyria.
In: G.E.W. WOLSTENHOLME und E.C.P. MILLER (Hrsg.): Ciba Foundation Symposium; J. & A. Churchill Ltd., London (1955) 195-208

170) SCHOLNICK, P.L., L.E. HAMMAKER und H. S. MARVER:
Soluble hepatic δ-aminolevulinic acid synthetase: end product inhibition of the partially purified enzyme.
Proc. nat. Acad. Sci. 63 (1969) 65-70

171) SCHULTZ, J.H.:
Ein Fall von Pemphigus leprosus compliciert durch Lepra visceralis.
Inauguraldissertation (Med.) Greifswald (1874)
Zit. nach Nr. 222

172) SCHUMAKER, H.M. und P.V. TISHLER:
A spot test for intermittent acute porphyria (AIP).
Clin. Res. 23 (1975) 579 A

173) SECCHI, G.C., L. ERBA und G. CAMBRIAGHI:
Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity of erythrocytes and liver tissue in man.
Arch. Environ Health 28 (1974) 130-132

174) SHANLEY, B.C., S.S. ZAIL und S.M. JOUBERT:
Effect of ethanol on liver -amino-laevulinic synthetase activity and urinary porphyrin excretion in symptomatic porphyria.
Brit. J. Haemat. 17 (1969) 389-396

175) SHEMIN, D. und D. RITTENBERG:
The utilisation of glycin for the synthesis of a porphyrin.
J. biol. Chem. 159 (1945) 567-568

176) SHEMIN, D. und D. RITTENBERG:
The biological utilisation of glycin for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin.
J. biol. Chem. 166 (1946) 621-625

177) SIMON, N., A. DOBOZY und G.Y. BERKO:
Porphyrinstoffwechsel- und klinisch-laboratoriumsmäßige Untersuchungen in Modellversuchen und an Patienten mit Porphyria cutanea tarda.
Arch. klin. exp. Derm. 238 (1970) 38-43

178) SIMON, M., G. KOSCSIS, G. NAGY und G. BERKO:
Über das familiäre Vorkommen der Porphyria cutanea tarda.
Derm. Wschr. 153 (1967) 452-454

179) SIMON, N., C.S. SIKLOSI und F. KOSZO:
The role of demages in cellular membrane structures in the development of porphyria cutanea tarda.
In: M. DOSS (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases.
Karger, Basel (1976) 432-437

180) SMITH, S.G., A.H. JACKSON und T.R. JACKSON:
Incubation of double labelled copro-porphyrinogen with chicken red cell hemolysates, chemical and TLC fractionation of extracts.
Ann. Clin. Res. vol 8 (suppl. 17) (1976) 53-55

181) SOLOMON, H.M. und F.H.J. FIGGE:
Porphyrin metabolism in mice following quantitative administration of collidine compounds and oxidation products.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 105 (1960) 484-485

182) SPARKS, R.D., V. FERRANS und F.M. HUNTER:
Hepatic fluorescence in porphyria cutanea tarda.
Sth. med. J. 58 (1965) 558-564

183) STEVENS, E., R.B. FRYDMAN und B. FRYDMAN:
Separation of porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III cosynthase from human erythrocytes.
Biochim. biophys. Acta 158 (1968) 496-498

184) STICH, W. und P. DECKER:
Studies on the mechanism of porphyrin biosynthesis with the aid of inhibitors.
In: G.E.W. WOLSTENHOLME und E.C.P. MILLER (Hrsg.): Ciba Foundation Symposium;
J. & A. Churchill Ltd., London (1955) 254-264

185) STOKVIS, B.J.: Over twee zeldzame Kleurstoffen in urine van zieken.
Weekblad van het Nederl. Tijdsch. v. Genesk. II No 13. (1889) 409-417

186) STONARD, M.D. und P.Z. NENOV:
Effect of hexachlorobenzene in hepatic microsomal enzymes in rat.
Biochem. pharmacol. 23 (1974) 2175-2183

187) STRAND, L.J., B.F. FELSHER, A.G. REDEKER und H.S. MARVER:
Heme biosynthesis in intermittent acute porphyria: Decreased hepatic conversation of porphobilinogen to porphyrins and increased delta aminolevulinic acid synthase activity.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67 (1970) 1315-1320

188) STRAND, L.J., J. MANNING und H.S. MARVER:
Acute intermittent porphyria: Studies of the enzymatic basis of disordered heme biosynthesis.
Sth. afr. J. lab. clin. Med. 17 (1971) 108-111

189) STRAND, L.J., U.A. MEYER, B.F. FELSHER, A.B. REDEKER und H.S. MARVER:
Decreased red cell uroporphyrinogen I synthase activity in intermittent acute porphyria.
J. Clin. Invest. 51 (1972) 2530-2536

190) STRIK, J.J.T.W.A.:
Chemical porphyria in Japanese quail.
Enzyme 16 (1973) 211-223

191) SWEENY, G.D., D. JANIGAN, D. MAYMAN und H. LAI:
Experimental porphyria. I. The experimental porphyrias - a group of distinctive metabolic lesions.
Sth. afr. J. lab. clin. Med. (Special issue) 17 (1971) 68-72

192) TAIT, G.H.:
Control of aminolaevulinate synthetase in Micrococcus denitrificans.
Enzyme 16 (1973) 21-27

193) TALJAARD, J.J.F., B.C. SHANLEY und S.M. JOUBERT:
Decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity in experimental symptomatic porphyria.
Life Sci. 10 (1971) 887-893

194) TALJAARD, J.J.F., B.C. SHANLEY, W.M. DEPPE und S.M. JOUBERT:
Porphyrin metabolism in experimental hepatic siderosis in the rat. II. Combined effect of iron overload and hexachlorobenzene.
Brit. J. Haematol. 23 (1972) 513-519

195) TALMAN, E.L., J.D. CASE, R.A. NEVE, R.F. LABBE und R.A. ALDRICH:
Porphyrin metabolism. I. Experimental porphyria in chick embryos.
J. biol. Chem. 212 (1955) 663-675

196) THUDICHUM, J.L.W.:
On cruentine.
Report Med. Off. Priv. Council X, Appendix 7 (1867) 227-233

197) TIEPERMANN, R.v., M. DOSS und K.F. LEONHARDT:
Uroporphyrinogen decarboxylase defect in red cells in chronic hepatic porphyria.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 47-47

198) TIEPERMANN, R.v., H. HEIL und M. DOSS:
Uroporphyrinogen synthase in red cells in acute intermittent porphyria.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 39-39

199) TIEPERMANN, R.v., G. TOPI, L. D'ALESSANDRO GANDOLFO und M. DOSS:
Uroporphyrinogen decarboxylase defect in erythrocytes in hereditary chronic hepatic porphyria.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 52-54

200) TIMME, A.H., J.J.F. TALJAARD, B.C. SHANLEY und S.M. JOUBERT:
Symptomatic porphyria. Part II. Hepatic changes with hexachlorobenzene.
Sth. afr. med. J. 48 (1974) 1833-1836

201) TOMIO, J.M., R.C. GARCIA, L.C. SAN MARTIN DE VIALE und M. GRINSTEIN:
Porphyrin biosynthesis. VII. Porphyrinogen carboxy-lase from avian erythrocytes. Purification and properties.
Biochim. Biophys. Acta 198 (1970) 353-362

202) TOMOKUNI, K. und T. KAWANISHI:
Relationship between activation of delta-aminolevulinic acid dehydratase by heating and blood lead level.
Arch. Toxikol. 34 (1975) 253-258

203) TOPI, G.C. und L.D'ALLESSANDRO GANDOLFO:
Clinic aspects, diagnosis and therapy of symptomatic and hereditary porphyria cutanea tarda.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 46-47

204) TSCHUDY, D.P.:
Biochemical lesions in porphyria.
J. Amer. med. Ass. 191 (1965) 718-730

205) TSCHUDY, D.P. und H.L. BONKOWSKY:
Experimental porphyria.
Fed. Proc. 31 (1972) 147-159

206) VIBRANS, U.:
Zur familiären Porphyria cutanea tarda.
Derm. Wschr. 159 (1973) 872-879

207) VOS, J.G., P.F. BOTTERWEG, J.J.T.W.A. STRIK und J.H. KOEMAN:
Experimental studies with HCB in birds.
TNO - nieuws 27 (1972) 599-603

208) WALDENSTRÖM, J.:
Studium über Porphyrie
Acta med. scand., suppl. 82 (1937)
3 - 155

209) WALDENSTRÖM, J.:
Neurological symptoms caused by so-called acute porphyria.
Acta psych. et neurol. Scand. 14 (1939)
375-383

210) WALDENSTRÖM, J.:
The porphyrias as inborn errors of metabolism.
Amer. J. Med. 22 (1957) 758-773

211) WALDENSTRÖM, J. und B. HAEGER-ARONSON:
Das klinische und biochemische Bild bei den verschiedenen Porphyrien.
Münch. med. Wschr. 106 (1964) 1333-1342

212) WALDENSTRÖM, J. und B. HAEGER-ARONSON:
The porphyrias: a genetic problem.
Prog. Med. Genet. 5 (1967) 58-101

213) WALDENSTRÖM, J. und B.C. WAHLQUIST:
Studien über die Entstehung der roten Harnpigmente (Uroporphyrin und Porphobilin) bei der akuten Porphyrie aus ihrer farblosen Vorstufe (Porphobilinogen).
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 260 (1939) 189-209

214) WATSON, C.J.:
The problem of porphyria. Some facts and questions.
New Engl. J. Med. 263 (1960) 1205-1215

215) WATSON, C.J.:
Porphyrin metabolism.
In: G.G. DUNCAN (Hrsg.): Diseases of Metabolism;
W.B. Saunders Company, Philadelphia und London (1965) 5. Auflage S. 850-887

216) WATSON, C.J.:
Hematin and Porphyria.
New Engl. J. Med. 293 (1975) 605-607

217) WATSON, C.J., C.A. PIERACH, J. BOSSENMAIER und R. CARDINAL:
Hepatic heme deficiency and repair by hematin infusions in the "inducible" hepatic porphyrias.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16 (1978) 44-44

218) WEISSMAN, E.B., L.C. CHENGAND, J.M. ORTEN:
The role of certain 5β -H-steroids in the regulation of porphyrin-heme formation.
Enzyme 16 (1973) 286-294

219) WESTALL, R.G.:
Isolation of porphobilinogen from the urine of a patient with acute porphyria.
Nature 170 (1952) 614-616

220) WITH, T.K.:
The clinical chemistry of the porphyrias.
Clin. Biochem. 1 (1968) 224-242

221) WITH, T.K.:
Hereditary hepatic porphyrias.
Acta med. scand. 186 (1969) 117-124

222) WITH, T.K.:
A short history of porphyrins and porphyrias.
In: M. DOSS und P. NAWROCKI (Hrsg.): Porphyrins in Human Diseases. Report of the Discussions.
Dr. Falk, Freiburg (1976) 289-308

223) ZAIL, S.S. und S.M. JOUBERT:
Hepatic δ-aminolaevulinic acid synthetase activity in symptomatic porphyria.
Brit. J. Haemat. 15 (1968) 123-129

I. A N H A N G

Herrn Prof. Dr. M. Doss danke ich für die Überlassung des Themas, die theoretische und praktische Einführung in das Forschungsgebiet und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und letztlich der hier vorgelegten Arbeit.
Diese Arbeit wurde im Rahmen des seit 1967 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschungsvorhaben über die Regulation der Porphyrinbiosynthese und über die Klinische Biochemie der Porphyrien durchgeführt. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte hierfür in großzügiger Weise Personal, Geräte und Verbrauchsmaterial zur Verfügung. Dafür gebührt ihr an dieser Stelle Dank.

Weitere Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit erhielt ich durch den Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg. Mein Dank gilt hier besonders der Klinikumsverwaltung.

Durch kooperative Arbeit mit einigen auswärtigen Kliniken und Instituten wurden die enzymatischen Untersuchungen bei Familienstudien ermöglicht.
Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich insbesondere bei den Herren Prof. Dr. W. Dölle,

Universitätsklinikum Tübingen, Chefarzt Dr. P.A. Lehr, Klinik der BVA Bad Homburg, Dr. K.F. Leonhardt, Universitätsklinikum Hamburg und Prof. Dr. G.C. Topi, Instituto Dermosifilopatico in Rom.

L e b e n s l a u f

Am 9. 1. 1943 wurde ich in Asendorf/Kreis Grafschaft Hoya geboren.
Von 1949 - 1953 besuchte ich die dortige Volksschule und anschließend die Albert-Schweitzer-Schule in Nienburg/W., wo ich 1964 die Reifeprüfung ablegte.
Von 1965 bis 1967 war ich in der Apotheke in Bruchhausen-Vilsen als Apothekerpraktikant zur Ausbildung.
Die Pharm. Vorprüfung bestand ich 1967 vor dem Prüfungsausschuß in Hannover.
Das Studium der Pharmazie begann ich im Sommersemester 1969 an der Philipps-Universität Marburg und legte am dortigen Institut für Pharm. Chemie 1973 das Staatsexamen ab.
Seit 1975 arbeite ich im Rahmen des Ergänzungsstudiums Humanbiologie an meiner Promotionsarbeit, die unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Doss steht, in der Abteilung für Klinische Biochemie im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Berndt, Böhme, Braun, Büsing, Dehnicke, Dimroth, Doss, Ebel, Egbring, Eger, Fruhstorfer, Golenhofen, Hartke, Ihm, Kaffarnik, Karlson, Kating, Kleine, Koransky, v. Kraft, List, Lorenz, Nultsch, Otto, Schmitz, Schneider, Seitz, Siegel, Siess, Stuke, Sturm, Unterhalt.